

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra biologických a lékařských věd

**Vyhodnocení aktivity potenciálně antifungálních látek pomocí
mikrodiluční bujónové metody II**

**(Evaluation of activity of potential antifungal substances through
the use of microdilution broth method II)**

Deriváty pyrazin-2-karboxamidu, 3-hydrazinopyrazin-2-karboxamidu, benzoxazinu,
2-isonikotinoylhydrazinkarboxylátu

Diplomová práce

Touto cestou bych ráda poděkovala vedoucí diplomové práce Mgr. Marcelle Vejsové za odbornou pomoc, rady a připomínky při zpracovávání této diplomové práce. Za poskytnuté vzorky děkuji Ing. Pavlu Skálovi, Doc. PharmDr. Miloši Macháčkovi CSc., Doc. PharmDr. Martinu Doležalovi, Ph.D.

Dále bych ráda poděkovala paní laborantce Idě Dufkové a kolegyni Jindřišce Nitraiové za technickou pomoc v laboratoři a psychickou podporu.

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

V Hradci Králové dne 30. 4. 2009

Pavla Rosíková

OBSAH

1. ABSTRAKT	5
2. ÚVOD.....	9
3. TEORETICKÁ ČÁST	10
3.1 OBECNÁ CHARAKTERISTIKA HUB	10
3.2 SYSTÉM LÉKAŘSKY VÝZNAMNÝCH HUB	10
3.2.1 ZYGOMYCETES	11
3.2.2 ASCOMYCETES	11
3.2.3 BASIDIOMYCETES	11
3.2.4 FUNGI IMPERFECTI	12
3.2.5 VLÁKNITÉ HOUBY	12
3.2.6 KVASINKY	12
3.2.7 DIMORFNÍ HOUBY	12
3.3 PŘEHLED TESTOVANÝH KMENŮ HUB.....	14
3.3.1 KVASINKY	14
3.3.2 VLÁKNITÉ HOUBY	18
3.4 ONEMOCNĚNÍ VYVOLANÁ HOUBAMI	21
3.4.1 MYCETISMY	21
3.4.2 MYKOTOXIKÓZY	21
3.4.3 MYKOALERGIE	21
3.4.4 MYKÓZY	21
3.5 LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA VLÁKNITÝCH HUB A KVASINEK.....	26
3.5.1 PŘÍMÉ MIKROSKOPICKÉ VYŠETŘENÍ	26
3.5.2 KULTIVAČNÍ VYŠETŘENÍ.....	27
3.5.3 NEKULTIVAČNÍ METODY (www.detskaonkologie.cz).....	30
3.6 LÉČBA HOUBOVÝCH INFEKcí	31
3.6.1 ANTIMYKOTICKÁ ANTIBIOTIKA.....	32
3.6.2 ANTIMETABOLITY	35
3.6.3 AZOLOVÁ ANTIMYKOTIKA	35
3.6.4 ECHINOKANDINY	42
3.7 TESTOVÁNÍ ANTIMYKOTICKÉ ÚČINNOSTI IN VITRO.....	45
3.7.1. DIFÚZNÍ DISKOVÁ METODA.....	46
3.7.2 TESTY STANOVENÍ MINIMÁLNÍ INHIBIČNÍ KONCENTRACE	46

3.7.3 TEST STANOVENÍ MFC	48
3.7.4 TEST STANOVENÍ POLOVIČNÍ RŮSTOVÉ RYCHLOSTI.....	48
3.7.5 TEST KLÍČIVOSTI SPÓR.....	48
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	49
4.1 SCHÉMA POKUSU	49
4.2 METODIKA	50
4.2.1 PŘÍPRAVA RŮSTOVÉHO MÉDIA.....	50
4.2.2 PŘÍPRAVA SUSPENZÍ TESTOVANÝCH KMENŮ HUB.....	50
4.2.3 PŘÍPRAVA ŘEDÍCÍ ŘADY TESTOVANÉ LÁTKY	51
4.2.4 PIPETOVÁNÍ DO DESTIČKY.....	51
4.2.5 VYHODNOCENÍ (ODEČET IC ₈₀)	52
4.3 SEZNAM TESTOVANÝCH LÁTEK.....	52
4.3.1 DERIVÁTY PYRAZIN-2-KARBOXAMIDU	53
4.3.2 DERIVÁTY 3-HYDRAZINOPYRAZIN-2-KARBOXAMIDU	57
4.3.3 5-KYAN-3-[(3-ETHYNYLFENYL)AMINO]PYRAZIN-2-KARBOXAMID.....	58
4.3.4 DERIVÁTY BENZOXAZINU	58
4.4 VÝSLEDKY	62
4.4.1 DERIVÁTY PYRAZIN-2-KARBOXAMIDU A 5-KYAN-3-[(3-ETHYNYLFENYL)AMINO]PYRAZIN-2-KARBOXAMID	62
4.4.2 DERIVÁTY 3-HYDRAZINOPYRAZIN-2-KARBOXAMIDU	66
4.4.3 DERIVÁTY BENZOXAZINU A DERIVÁTY 2-ISONIKOTINOYLHYDRAZINKARBOXYLÁTU	67
5. DISKUZE	69
6. ZÁVĚR	73
7. PŘÍLOHY	74
7.1 PŘÍLOHA Č.1	74
7.2 PŘÍLOHA Č.2.....	75
8. SEZNAM LITERATURY	76
9. SEZNAM OBRÁZKŮ.....	79
10. SEZNAM TABULEK	81
11. SEZNAM ZKRATEK	82

1. ABSTRAKT

Rosíková Pavla

Vyhodnocení aktivity potenciálně antifungálních látek pomocí mikrodiluční bujónové metody II

Diplomová práce

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Farmacie

Cílem této diplomové práce bylo otestovat možnou antifungální aktivitu vzorků látek nasyntetizovaných na Katedře farmaceutické chemie a kontroly léčiv a Katedře anorganické a organické chemie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové.

Látky byly testovány mikrodiluční bujónovou metodou. Testování bylo provedeno na osmi kmenech kvasinek a vláknitých hub: *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida glabrata*, *Trichosporon beigelii*, *Aspergillus fumigatus*, *Absidia corymbifera*, *Trichophyton mentagrophytes*.

Celkem bylo otestováno 49 látek, které jsou rozděleny do čtyř skupin podle jejich chemické struktury. Deriváty pyrazin-2-karboxamidu, deriváty 3-hydrazinopyrazin-2-karboxamidu, deriváty 2-isonikotinoylhydrazinkarboxylátu, deriváty benzoxazinu.

Skupina derivátů pyrazin-2-karboxamidu, která je substituovaná malým alkylem ($-CH_3$) v poloze 5 pyrazinu, a u které je dusík amidové skupiny substitovaný fenylem s elektronegativní skupinou ($-CF_3$, $-F$, $-Cl$) nebo hydroxy skupinou ($-OH$) v poloze *m*, vykazovala při vyšších koncentracích účinnost na některé kvasinky a vláknité houby. Substituce dusíku amidové skupiny disubstituovaným fenylem měla negativní účinek na antifungální aktivitu u většiny testovaných látek z této skupiny derivátů.

Všechny látky skupiny derivátů 3-hydrazinopyrazin-2-karboxamidu (kromě jedné z přečištěných látek) byly účinné na *Trichophyton mentagrophytes*. Podstatou účinku derivátu benzoxazinu je substituce oxo skupinou v polohách 2, 4 fenylem na dusíku v poloze 3 benzoxazinu a hlavně hydroxy skupinou v poloze 8. Deriváty benzoxazinu s hydroxy skupinou v poloze 8 byly účinné na všechny druhy testovaných kmenů.

Deriváty 2-isonikotinoylhydrazinkarboxylátu byly neúčinné.

Nejúčinnějšími látkami byly z derivátů pyrazin-2-karboxamidu MD458, MD528; z derivátů 3-hydrazinopyrazin-2-karboxamidu DK-5, DK-19; z derivátů benzoxazinu RAM 347, RAM 351, RAM 348.

ABSTRACT

Rosíková Pavla

Evaluation of activity of potential antifungal substances through the use of microdilution broth method II

Diploma thesis

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove

Pharmacy

The aim of this diploma thesis was testing of samples of substances produced at the Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control and the Department of Inorganic and Organic Chemistry Faculty of Pharmacy of Charles University in Hradec Kralove.

Substances were tested by using microdilution broth method. Testing was carried out on eight strains of yeasts and filamentous fungi: *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida glabrata*, *Trichosporon beigeli*, *Aspergillus fumigatus*, *Absidia corymbifera*, *Trichophyton mentagrophytes*.

Total were tested 49 substances, which are divided into four groups according to their chemical structure. Derivatives pyrazin-2-carboxamide, 3-derivatives hydrazinopyrazin-2-carboxamide, 2-derivatives isonikotinoylhydrazinkarboxylate, benzoxazin derivatives.

Group of derivatives pyrazin-2-carboxamide, which is substituted by low alkyl (-CH₃) in the position 5 of pyrazin, and in which is nitrogen of amid group substituted by the phenyl with electronegative group (-CF₃, -F, -Cl, -OH) or with hydroxy group in position *m*, showed higher concentrations in the effectiveness of some yeasts and filamentous fungi. The Substitution on nitrogen of amide group with disubstituted phenyl had a negative effect on the antifungal activity of the most of tested substances from this group of derivatives.

All Group of derivatives 3-hydrazinopyrazin-2-carboxamide (except one of re-cleaned substance) to be effective on *Trichophyton mentagrophytes*. The effect of the derivatives of benzoxazin is the substitution by oxo group in positions 2 and 4, phenyl on the nitrogen in position 3 and mainly benzoxazin hydroxy group in the 8th position.

Benzoxazin derivatives with hydroxy group in position 8 have been effective at all tested strains.

Derivatives of 2-isonikotinoylhydrazinkarboxylate were ineffective.

The most effective substances were from derivatives of the pyrazin-2-carboxamide MD458, MD528, from derivatives of 3-hydrazinopyrazin-2-carboxamide DK-5, DK-19; benzoxazin derivatives of RAM 347, RAM 351, RAM 348.

2. ÚVOD

Zvyšující se úroveň zdravotní péče, stárnoucí populace a stále náročnější invazivní postupy diagnostiky i léčby přinášejí pro pacienty nová nebezpečí. V posledních letech se stává jedním z dominantních problémů vzrůstající incidence mykotických infekcí. V nedávné době ojedinělá onemocnění jsou především na jednotkách intenzivní péče (JIP), závažným problémem s vysokou mortalitou a současně významným způsobem zvyšují náklady na léčbu pacientů. Mykotické infekce s plíživými příznaky mohou mít fatální následky. Nejčastěji se vyskytující původce těchto infekcí *Candida albicans* si drží více než 50% četnost, ale je čím dál častěji doplňována nebo nahrazena rezistentnějšími kmeny - *Candida glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* nebo *C. krusei*. Velmi invazivní, často hematogenní cestou se šířící, mikromyceta rodu *Aspergillus* je zatím na JIP zastoupena v jednotlivých procentech, ostatní fungální infekce jsou spíše výjimkou (Tichý, 2009).

Z výše zmíněných důvodů je zřejmé, že je nutno zabývat se studiem nových antifungálně účinných látek, které by přinesly nové možnosti v léčbě mykóz.

Cílem této diplomové práce je otestovat potencionálně účinné antifungální látky vyrobené na Katedře farmaceutické chemie a kontroly léčiv a Katedře anorganické a organické chemie. Pro testování byla použita mikrodiluční bujónová metoda. Testování bylo provedeno na osmi kmenech nejčastěji se vyskytujících patogenních kvasinek a vláknitých hub.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1 OBECNÁ CHARAKTERISTIKA HUB

Říše Hub (Fungi), jedna z pěti samostatných říší (Buchta, 1998), zahrnuje na 100 000 druhů, z nichž jen asi 300 druhů se účastní onemocnění člověka a zvířat (Fragner, 1984) a může způsobovat národohospodářské ztráty (Buchta, 1998).

Jedná se o jedno i vícebuněčné eukaryotické organismy (Buchta, 1998) – heterotrofy, saprofyty, parazity nebo komenzály (Greenwood, 1999). Řada hub je využívána ku prospěchu člověka – průmyslová výroba potravin (pivo, víno, sýry), léků (antibiotika, cyklosporin, alkaloidy), organických látek (kyseliny, alkohol, enzymy, vitamíny), ale i genetické (studium genetických pochodů, genové manipulace) a metabolické (biotransformační) studie (Buchta, 1998).

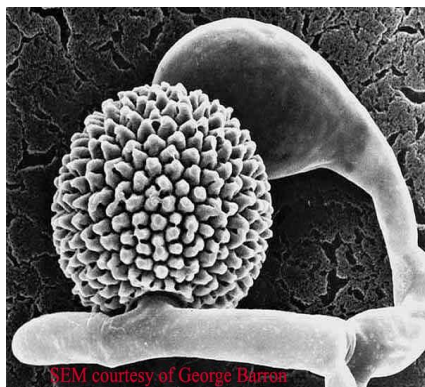
Houby jsou chemoheterotrofní organismy, jejichž metabolismus je uzpůsoben k získávání energie a intermediárních sloučenin z látek organického původu. Vedle primárního metabolismu je pro houby charakteristická produkce a sekrece velkého a různorodého počtu látek, jejichž funkce není mnohdy objasněna (sekundární metabolismus). Houbové buňky se více podobají savčím buňkám, než bakteriím. Základní stavební jednotkou vyšších hub (Eumycota) je vlákno – hyfa – jedno-, dvou- nebo mnohoaderná trubkovitá struktura, která může být opatřena přehrádkou (septum). Hyfy rostou vrcholovým růstem, větví se a splétají se v podhoubí neboli mycelium. Na specializovaných hyfách se tvoří spóry (výtrusy), nepohlavní spóry jsou konidie, které se tvoří na jiných hyfách. Makroskopický vzhled kolonií je pro určité druhy nebo skupiny charakteristický a může sloužit jako pomocné kritérium při jejich identifikaci (Buchta, 1998).

3.2 SYSTÉM LÉKAŘSKY VÝZNAMNÝCH HUB

Klasifikace hub vychází ze způsobu jejich rozmnožování, morfologie reprodukčních (sexuálních či asexuálních) orgánů, spor a jiných buněčných struktur, popř. z biochemických vlastností. Prakticky všechny patogenní houby pro člověka patří mezi vyšší pravé houby (*Eumycota*), které dělíme do čtyř hlavních taxonomických skupin (Obr. 4).

3.2.1 ZYGOMYCETES

Mycelium je tvořeno hyfami bez přepážek. Kolonie jsou tvořeny typickým vysokým vzdušným myceliem, výsledkem pohlavního procesu je vznik zygospóry. Většina druhů je saprofytických, malá část parazituje živočichy, rostliny a jiné houby.



Obr. 1 Zygospóra rodu *Zygorhynchus*

<http://www.clarku.edu/faculty/dhibbett/TFTOL/content/1introprogress.html>

3.2.2 ASCOMYCETES

Mycelium je septované, sexuální rozmnožování je charakterizováno tvorbou askospór. Zahrnují saprofytické druhy, ale i druhy parazitující na rostlinách a živočiších.



Obr. 2 Typická pohárovitě-tvarovaná plodnice Ascomycetes, druh *Galiella*

<http://www.clarku.edu/faculty/dhibbett/TFTOL/content/1introprogress.html>

3.2.3 BASIDIOMYCETES

Mycelium je přehrádkované a splétá se v typicky zbarvené bílé podhoubí, tvořené dvoujadernými buňkami. Nápadná je tvorba charakteristických plodnic, které se u řady zástupců sbírají ke konzumaci, zatímco u jiných mohou vyvolat alimentární

otravy. Většina druhů žije saprofytický, často v symbióze s kořenovým systémem rostlin, část parazituje na rostlinách, vzácně i na člověku (Buchta, 1998).



Obr. 3 Charakteristický tvar plodnic třídy Basidiomycetes

<http://www.clarku.edu/faculty/dhibbett/TFTOL/content/1introprogress.html>

3.2.4 FUNGI IMPERFECTI

Představují umělý taxon, zahrnující nepohlavní stádia hub, která se rozmnožují pomocí konídií nebo vegetují jako sterilní mycelium.

V lékařské terminologii se patogenní houby dělí na kvasinky a vláknité houby. Jedná se o jednodušší dělení nesouvisející se systematikou, ale vycházející z převládajícího typu vegetativní formy (Greenwood, 1999).

3.2.5 VLÁKNITÉ HOUBY

Vláknité neboli myceliové houby jsou složeny z větvených vláken – HYFY, které vytvářejí spleť hmoty – MYCELIUM. Vláknité houby se rozmnožují pomocí spór, jež vytvářejí často ve velkém množství.

3.2.6 KVASINKY

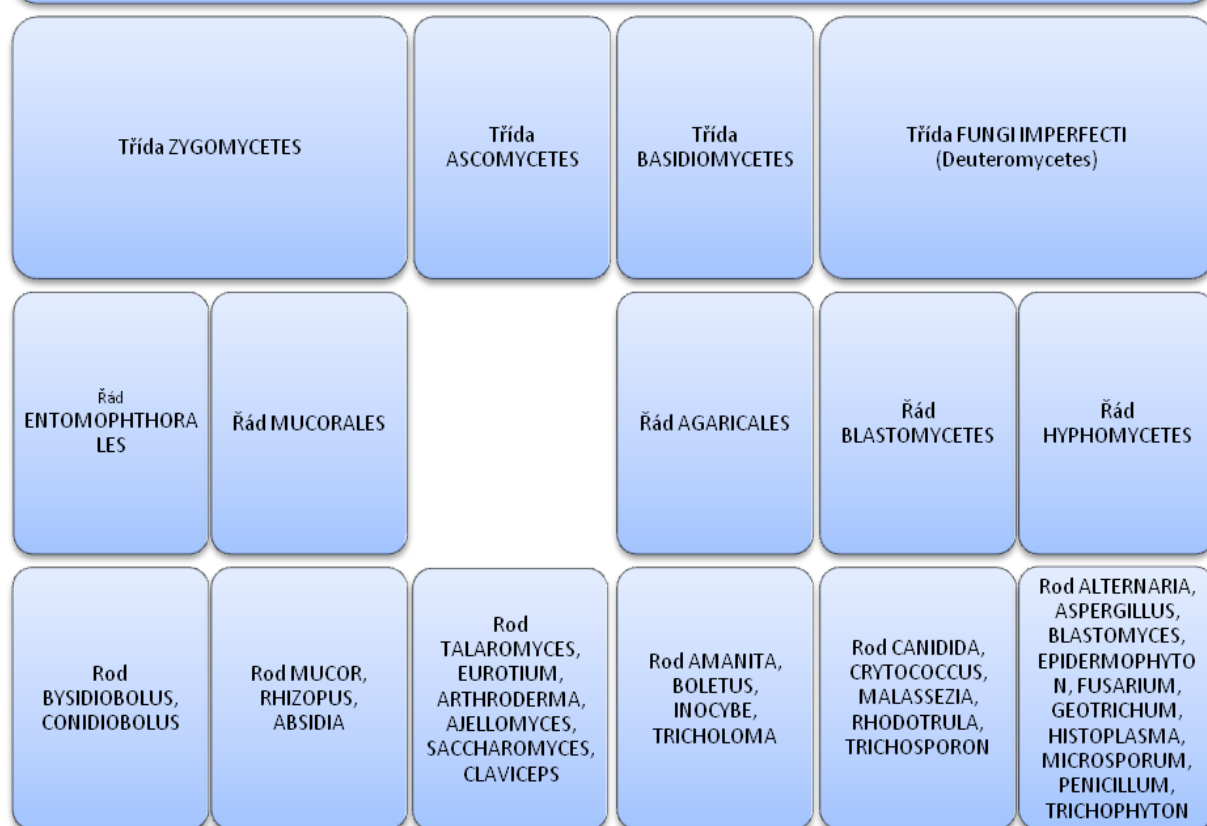
Většinou se jedná o jednobuněčné organismy množící se nepohlavně procesem označovaným PUČENÍ.

3.2.7 DIMORFNÍ HOUBY

Tvoří speciální skupinu hub, které rostou buď ve fázi myceliové nebo v kvasinkovém stádiu a to podle růstových podmínek

ŘÍŠE FUNGI

Oddělení EUMYCOTA



Obr. 4 Systém lékařsky významných hub

Buchta V., Horáček J., Horák V., Základy mikrobiologie a parazitologie pro farmaceuty

3.3 PŘEHLED TESTOVANÝH KMENŮ HUB

3.3.1 KVASINKY

Jednobuněčné organismy vyskytující se v přírodě, v kvasících ovocných šťávách, ovoci, půdě. Některé mají průmyslový význam – při výrobě piva, vína, alkoholických nápojů, pekařského droždí, jiné vyvolávají onemocnění lidí a zvířat. Některé kvasinky nalezené u člověka evidentně pocházejí z jeho pracovního a životního prostředí.

***Candida albicans* (CA)**

Ve volné přírodě se nachází jen ojediněle, především ve výkalech zvířat a v půdě. V lidském materiálu se vyskytuje ze všech kvasinek nejčastěji. CA je hlavním původcem kandidóz, nejčastěji kandidózy kůže, paronychia (rukou), onychomykózy (rukou), kandidózy sliznic (soor dutiny ústní, vaginální fluóry). Méně časté jsou otomykózy, kožní granulomy, balanitidy, oční keratomykózy. Krevní cestou je možné zanesení do jakéhokoliv orgánu, nejčastěji do plic (Fragner, 1984).



Obr. 5 *C. albicans* na Sabouraudově glukózovém agaru s typickými krémově zbarvenými, voskovitými, na povrchu hladkými koloniemi, po 7 denní kultivaci při 35°C.

Foto: Mgr. Marcela Vejsová

***Candida tropicalis* (CT)**

C. tropicalis se zařazuje mezi patogenní kvasinky. Nejčastěji se však vyskytuje jako všeobecný komenzál v ústech, trávicím ústrojí, v plicích, ve vagíně, na pokožce lidí a zvířat. Velmi často se vyskytuje v kvasném průmyslu. Svojí houževnatostí a malou náročností na podmínky výživy vytlačuje často z fermentačního procesu jiné kvasinky. Používá se na výrobu krmného droždí, je to druh velmi podobný *C. albicans*, o čemž svědčí mikroskopický vzhled kultury i numerická taxonomie (www.vscht.cz).

Člověku způsobuje smrtelná systémová onemocnění, sepse, endokarditis, oční onemocnění, kožní kandidózy, paronychia a onychomykózy rukou, otomykózy, vaginální kandidózy (Fragner, 1984).



Obr. 6 *Candida tropicalis* na Sabouraudově glukózovém agaru po 7 denní inkubaci při 35°C

Foto: Mgr. Marcela Vejsová

***Candida krusei* (CK)**

Přirozeně se vyskytuje v jogurtu, datlích, kvasícím kakau, ovocných šťávách, je původcem „křísu“ vína a piva. Dále se vyskytuje v trávicím ústrojí koně a racka (Fragner, 1984).

Člověku způsobuje vaginální kandidózy, slizniční mykózy i fungémie, zvláště u pacientů se sníženou imunitou.



Obr. 7 *Candida krusei* na Sabouraudově glukózovém agaru po 7 denní inkubaci při 35°C

Foto: Mgr. Marcela Vejsová

***Candida glabrata* (CG)**

Obvykle se vyskytuje v běžné mikroflóře člověka, na kůži a v urinálním traktu (www.mycology.adelaide.edu.au). U člověka způsobuje torulopsózu, vaginální fluóry, vzácně sepse, fungémie, endokarditis a různá systémová onemocnění (Fragner, 1984).

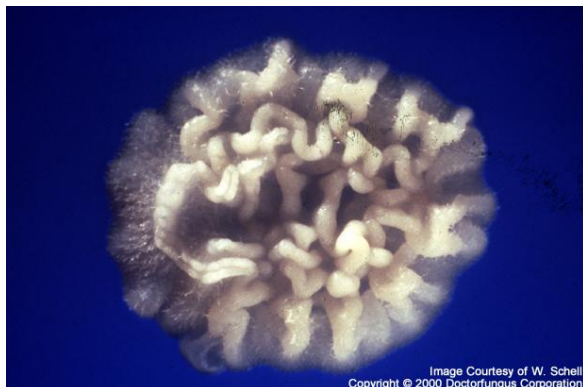


Obr. 8 *Candida glabrata* na Sabouraudově agaru po 7 denní inkubaci při 35°C

Foto: Mgr. Marcela Vejsová

***Trichosporon beigelii* (TB)**

Jedná se o všudypřítomnou kvasinku, která žije v půdě, ale může být také přítomna na lidské kůži, v dýchacích a močových cestách, nehtech, jako součást běžné lidské mikroflóry. Způsobuje onemocnění nazývané „bílá piedra“, povrchní dermatitidy, ale u imunokomprimovaných pacientů může způsobovat i fatální systémové mykózy. Jedná se o velmi těžce rozpoznatelné infekce, z důvodu blízké podobnosti s jinými kandidovými infekcemi (www.nature.com).



Obr. 9 Vzrostlá, voskovitá kolonie *Trichosporon beigelii* na Sabouraudově glukózovém agaru, při 30°C

http://www.doctorfungus.org/imageban/index_enlarge.pl



Obr. 10 *Trichosporon beigelii* na Sabouraudově agaru po 7 denní inkubaci při 30° C

Foto: Mgr. Marcela Vejsová

3.3.2 VLÁKNITÉ HOUBY

***Absidia corymbifera* (AC)**

Patří mezi houby mukorovité – Mucoraceae. Onemocnění, která absidie způsobují, se nazývají mukormykózy (pojmenované podle řádu Mucorales). Mukormykózy představují převážně orgánová a systémová onemocnění. Nejčastějšími lokalizacemi jsou u člověka oblasti ušní, rinocerebrální, plicní a gastrointestinální. Vstupní branou je dýchací ústrojí. Tyto houby mají zvláštní afinitu ke krevním cestám, v nichž mohou tvořit tromby ze živého mycelia.

AC se vyskytuje v půdě, seně, pšenici, rýži, sojových bobech, mouce, hrachu, arašídové mouce, jahodách, krysím a králíčím trusu. U člověka je původcem otitidy a granulomu v kůži hrudníku (Fragner, 1984).



Obr. 11 *Absidia corymbifera* s typicky hruškovitě-tvarovaným sporangiem

http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Zygomycetes/Absidia/

***Aspergillus fumigatus* (AF)**

Patří mezi houby kropidlákovité – Aspergillaceae. Rod *Aspergillus* s velkým počtem druhů je rozšířen po celém světě. Vyskytuje se v půdě, účastní se rozkladných procesů v přírodě, kromě toho bývá nalézán na různých substrátech – pícech, zrní, zelenině a ovoci. Některé druhy mají značný průmyslový význam (*Aspergillus flavus*, *A. oryzae*, *A. tamarii*). Kromě aflatoxinů produkují i jiné zajímavé látky – alkaloidy festuklavin, fumigaklavin A a B (*A. fumigatus*), fibrinolysin (*A. fumigatus*) (Fragner, 1984).



Obr. 12 *Aspergillus fumigatus* na Czapekově agaru po 7 dnech růstu při 25 °C

http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Aspergillus_fumigatus.jpg



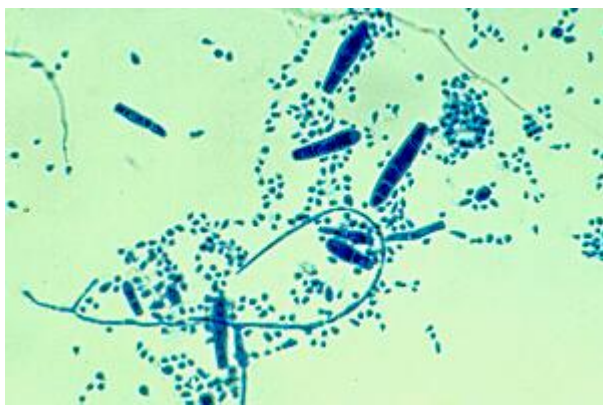
Obr. 13 Rod *Asperillus* na Sabouraudově glukózovém agaru s chloramfenikolem

<http://www.flickr.com/photos/neilhawthorne/170633329/>

***Trichophyton mentagrophytes* (TM)**

Některé druhy lze označit jako geopolitně rozšířené. Rozlišujeme tři druhy dermatofytů – zoofilní, antropofilní, geofilní. TM patří mezi antropofilní druhy.

Způsobuje dermatofytózy vlasaté části hlavy, trupu a končetin, intertrigenózních ploch, nohou, rukou, nehtů; systémová a orgánová onemocnění (Fragner, 1984). Pro vznik onemocnění je predisponujícím faktorem zapáření či místa s navzájem se o sebe otírající kůže (podpaží, třísla).



Obr. 14 Mikrokonidie, makrokonidie a spirální vlákna *T. mentagrophytes*.

http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Dermatophytes/Trichophyton/mentagrophytes.html



Obr. 15 Kultura *Trichophyton mentagrophytes* na Sabouraudově glukózovém agaru.

http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Dermatophytes/Trichophyton/mentagrophytes.html

3.4 ONEMOCNĚNÍ VYVOLANÁ HOUBAMI

Rozeznáváme 4 způsoby poškození člověka houbami:

3.4.1 MYCETISMY

Jedná se o alimentární otravy následkem požití plodnic vyšších hub a intoxikací jejich toxiny (Buchta, 1998).

3.4.2 MYKOTOXIKÓZY

Otravy toxiny nebo jinými toxickými látkami sekundárního metabolismu hub, které jsou obvykle součástí kontaminované potravy (Buchta, 1998).

3.4.3 MYKOALERGIE

Jsou hypersenzitivní reakce imunitního systému hostitele na antigenní stimulaci houbového alergenu (Buchta, 1998).

3.4.4 MYKÓZY

3.4.4.1 Povrchové mykózy

Ze všech mykóz nejběžnější a všeobecně rozšířená onemocnění kůže, vlasů, nehtů a sliznic (Greenwood, 1999).

1) DERMATOMYKÓZY

Postihují keratinizované vrstvy kůže, vlasové folikuly, nehtové lůžko a valy (Buchta, 1998). Jsou vyvolávány plísněmi zvanými dermatofyty. Označují se *dermatofytóza*, nebo *tinea* (např. *tinea pedis*, *tinea capitis*). Jsou způsobovány asi dvaceti druhy dermatofytů, nejčastější původci onemocnění v Evropě jsou: *Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophytes*, *T. verrucosum*, *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum canis*. Dermatomykózy se šíří přímým nebo nepřímým kontaktem s infikovanou osobou nebo zvířetem (koupaliště, sprchy, ručníky, hřebeny) (Greenwood, 1999). Onemocnění je doprovázeno imunitní reakcí, projevující se patologickými změnami hlubších partií kůže (Buchta, 1998). Někdy se infekce projevuje jen suchým olupováním nebo hyperkeratózou, častěji drážděním, zčervenáním, otokem a tvořením puchýřků. Infekce na těle, v obličeji a kštici se šíří jako prstencové léze.

Tinea pedis většinou postihuje meziprstní prostory, ale může se šířit i na chodidlo, často se vyvíjí bolestivá sekundární bakteriální infekce. Při infekci nehtu se nehet odbarvuje, ztlušťuje, zvedá a drolí.

Tinea capitis – infekce vlasaté části – tvoří se lupy a vypadávají vlasy. Houba proniká do vlasaté části hlavy, kde se hyfy segmentují na řetězce artrokonidií.

Infekce ve slabinách, na rukou a nehtech je téměř vždy až druhotná po primárním postižení nohou (Greenwood, 1999).

2) POVRCHOVÁ KANDIDÓZA

Je rozšířena po celém světě, postihuje kůži, nehty a sliznici úst a pochvy, kandidóza sliznic se běžně nazývá moučnivka. *Candida albicans* se izoluje z 80-90% všech kandidóz, ale vyskytují se i jiné druhy – *Candida parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*.

Kandidy se vyskytují v malém množství v běžné flóře; přerůstají a způsobují infekci při zásahu do normální flóry nebo při snížení celkové rezistence organismu nemocí.

Infekce sliznic – tvoří se ohraničené bílé skvrny, mohou i splývat a vytvářet pseudomembrány tvarohového typu. Vaginální kandidóza je častá zejména v těhotenství, při postižení jsou bílé léze na epitelu vulvy, pochvy a cervixu doprovázeny svěděním, škrábáním a bílým tvarohovitým výtokem.

Infekce kůže a nehtů – vyskytuje se v místě vlhké zapádky, axilách, tříslech, na perineu, pod prsy a někdy mezi prsty. U dětí se projevuje jako dermatitida pod plenkami.

Chronická kandidóza kůže a sliznic – vzácná forma kandidózy, která se objevuje v dětství a přechází v perzistující, někdy granulomatózní infekci úst, kůže a nehtů. Někteří pacienti mají malý defekt ve funkci lymfocytů a neutrofilů.

3) JINÉ POVRCHOVÉ INFEKCE

Infekce kůže a nehtů mohou způsobovat také plísně, které nepatří k dermatofytům.

Tinea nigra – povrchové asymptomatické onemocnění, charakterizované pigmentovými skvrnami různé velikosti, obvykle na dlaních a chodidlech, způsobené *Phaeoannelomyces werneckii*.

Pityriasis versicolor – chronická infekce *stratum corneum*, způsobená lipofilní kvasinkou *Malassezia furfur*, projevuje se odbarvenými skvrnami na kůži. *M. furfur* se běžně vyskytuje na kůži a většina infekcí je endogenní. Je častá v tropech a postihuje mladé dospělé lidi.

Bílá piedra – onemocnění vyvolané kvasinkovým mikroblem *Trichosporon beigeli*, projevující se světlehnědými uzlíky různé velikosti na vlasové pochwě, nejčastěji v axile.

Černá piedra – vyvolává ji *Piedraia hortae*, charakteristická je přítomnost černých tuhých uzlíků v průměru až 1mm, nejčastěji ve kštici, vyskytuje se ve vlhkém tropickém podnebí (Greenwood, 1999).

3.4.4.2 Podkožní infekce

Houbové infekce, jejichž vznik je obvykle podmíněn traumatickou inokulací mykotického agens, postiženy jsou hlubší vrstvy dermis, subkutánní tkáň, popř. i kosti. Onemocnění se manifestuje typickými kožními a podkožními lézemi. Vyskytují se hlavně v tropických oblastech (Buchta, 1998).

Chromoblastomycóza – bradavičnaté léze pokryté strupy (*Fonsecaea pedrosi*, *F. compacta*, *Phialophora verrucosa*, *Exophiala dermatitidis*, *Cladosporium caririonii*)

Feohyfomykóza – nespecifické solitární podkožní léze způsobené černě zbarvenými houbami

Sporotrichóza – chronické hnisavé granulomatózní onemocnění kůže a podkoží (*Sporothrix schenckii*)

Rinosporidóza – chronické granulomatózní postižení sliznic a kůže, charakterizované tvorbou rozsáhlých polypů nebo bradavicových lézí v nose nebo ve spojivce (*Rhinosporidium suberin*)(Greenwood, 1999).

3.4.4.3 Systémové mykózy

Onemocnění postihující jeden nebo více orgánů, která mohou diseminovat a přejít do septického stavu, zvláště u imunoalterovaných pacientů.

1) PRIMÁRNÍ MYKÓZY

Infekce způsobené dimorfními houbami, v některých případech kvasinkou *Cryptococcus neoformans* (Buchta, 1998).

Infekce vyvolané dimorfními houbami

- BLASTOMYKÓZA – chronická infekce plic, která se může šířit do dalších tkání, na kůži a do kostí.
- KOKCIDIOIDOMYKÓZA – asymptomatické nebo spontánně se hojící plicní onemocnění, které se může vyvinout v progresivní sekundární smrtelnou infekci.
- HISTOPLASMÓZA – bezpříznakové nebo relativně mírné plicní onemocnění, u kterého je někdy pozorováno akutní chřipkové onemocnění s horečkou a neproduktivním kašlem.
- PARACOKCIDIOIDOMYKÓZA – postihuje plíce, sliznice, kůži a lymfatický systém. Neléčené končí smrtí (Greenwood, 1999).

Kryptokokóza

Původcem je opouzdřená kvasinka *Cryptococcus neoformans*, způsobuje onemocnění CNS, ačkoliv primární je postižení plic. Vyskytuje se sporadicky na celém světě, ale hlavně u pacientů s AIDS (Greenwood, 1999).

2) SEKUNDÁRNÍ MYKÓZY (oportunní mykózy)

Infekce imunoalterovaných pacientů způsobených oportunními houbami, které pro zdravého jedince nepředstavují reálné nebezpečí (Buchta, 1998).

- KANDIDÓZA – je lokalizovaná např. v močovém ústrojí, játrech, ledvinách, na srdečních chlopních (endokarditida), meningách, dutině břišní nebo diseminovaná a spojená se sepsí. Nejčastějším původcem je

Candida albicans, často *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*. Nejčastěji se projevuje u pacientů po operaci nebo při imunosupresi.

- ASPERGILÓZA – onemocnění vyvolává *Aspergillus fumigatus*, *A. niger*, *A. flavus*, *A. terreus*, *A. nidulans*. Postihuje nejčastěji plíce, ale i vedlejší nosní dutiny a povrchové tkáně.
 - Alergická aspergilóza se vyskytuje u atopií se zvýšenou hladinou IgE, několik hodin po expozici se dostaví dušnost, horečka a únava, opakované ataky mají za následek progresivní poškození plic. Vzniká syndrom plíce sládků, projevující se u pivovarských dělníků, kteří pracují s ječmenem.
 - Aspergilom – houba kolonizuje již vytvořené (tuberkulózní) dutiny v plicích a vytváří kompaktní koule mycelia. Pacienti jsou bez příznaků nebo mají jen mírný kašel.
 - Invazivní aspergilóza se vyskytuje u osob se sníženou imunitou, majících nějaké těžké onemocnění. Jsou napadeny plíce, kde se aspergilus množí a ničí tkáň, proniká do cév a způsobuje trombózu.
 - Endokarditida se vyskytuje u pacientů po chirurgickém výkonu na otevřeném srdci.
 - Granulom ve vedlejších nosních dutinách, aspergilus kolonizuje paranazální dutiny, odkud se šíří do očnice a mozku .
- ZYGOMYKÓZA (muromykóza) – poměrně vzácné onemocnění způsobené plísněmi rodu *Mucor*, *Absidia*, *Rhizopus*. Nejznámější je mozková forma, vyskytuje se u pacientů s diabetes mellitus, leukémií nebo lymfomem (Greenwood, 1999).

3.5 LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA VLÁKNITÝCH HUB A KVASINEK

VLÁKNITÉ HOUBY- diagnostika spočívá v hodnocení makroskopického vzhledu primokultur (případně ve vzhledu vpichových a izolovaných kolonií), současně s mikroskopickým obrazem kultur.

KVASINKY – rutinní diagnostika kvasinek je zaměřena především na průkaz druhu *Candida albicans*, který je v lidském infekčním materiálu nejčastější. Používají se rychlé metody jako např. hodnocení barvy na chromogenních médiích nebo test indukce tvorby klíčnic hyf. Jestliže je vyloučena možnost, že jde o *C. albicans*, kultury se přeizolují a provedou se z nich cukerné nebo dusíkové auxogamy, případně zymogamy a další zkoušky ke zjištění druhu kandidy (Fragner, 1984).

Úspěch laboratorní diagnostiky záleží na správně odebraném vzorku a na přesných údajích sdělených laboratoři.

Nejvhodnějšími vzorky pro vyšetření povrchových mykóz jsou: odloupnuté šupinky kůže, části nehtu a seškrab kštice obsahující vlasové kořínky a kožní šupinky. Při podezření na kandidózu se odebírají stěry ze sliznic a odesílají se o laboratoře, nejlépe v transportní půdě. U podkožních infekcí jsou nejvhodnějšími vzorky krusty, seškraby, aspiráty hnisu a bioptický materiál. Při systémových infekcích se odebírají vzorky z co největšího počtu míst.

3.5.1 PŘÍMÉ MIKROSKOPICKÉ VYŠETŘENÍ

Většinu vzorků lze vyšetřit ve vlhkých preparátech po částečném natrávení tkáně 10-20% hydroxidem draselným či sodným. Preparáty obarvené dle Grama se používají pro diagnózu kvasinkových infekcí sliznic, fluorescenční znázornění lze použít při vyšetření tkání a nátěrů.

Histologické vyšetření je vhodné k průkazu invazivního onemocnění, není však proveditelné u pacientů dlouhodobě vážně nemocných a zesláblých. Pro barvení se používají speciální metody – barvení Schiffovou metodou (PAS) a metodou stříbření podle Grocotta a Gomoriho (Greenwood, 1999).

3.5.2 KULTIVAČNÍ VYŠETŘENÍ

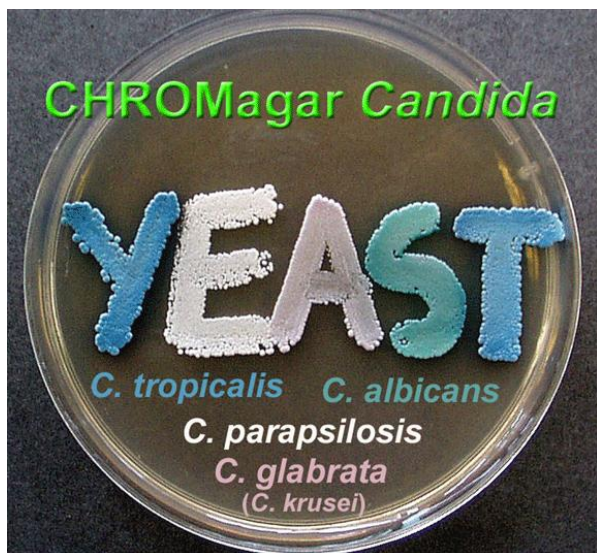
Většina patogenních hub se snadno kultivuje. Nejužívanější je Sabouraudův agar, jež je složen z glukózy a 4% sladového agaru. K potlačení bakterií se doplňuje chloramfenikolem a u saprofytických hub cykloheximidem (Greenwood, 1999). Při některých infekcích můžeme však na agaru s cykloheximidem dostat výsledky zkreslené, jelikož cykloheximid inhibuje růst celé řady vláknitých hub a některých kvasinek (např. *Candida parapsilosis*), nikoliv však *Candida albicans*. Proto při podezření na smíšené infekce dermatofytů s kvasinkami, případně jinými houbami, používáme současně půdy s chloramfenikolem a cykloheximidem, tak půdy jen s chloramfenikolem (Fragner, 1984).

Kultivační vyšetření poskytuje jednoznačný výsledek, když se izoluje známý patogen nebo když se houby izolují z normálně sterilního místa (Greenwood, 1999).

3.5.2.1 Živé půdy (Fragner, 1984)

- SABOURAUDŮV GLUKÓZOVÝ AGAR s chloramfenikolem
- SABOURAUDŮV GLUKÓZOVÝ AGAR s chloramfenikolem a cykloheximidem
- ŽIVNÁ PŮDA S INDIKÁTOREM PRO PĚSTOVÁNÍ DERMATOFYTŮ – všechny dermatofyty se na této původně žluté půdě zbarvují červeně a také červeně zbarvují půdu v okolí. Podobnou reakci dávají někteří mikrobi, vzácně kvasinky i některé vláknité houby, které však lze od dermatofytů většinou snadno rozlišit podle vzhledu kolonií.
- N-AGAR PODLE GEORGOVÉ k rozlišení *Trichophyton megninii* a *Trichophyton rubrum*
- CZAPEK- DOX - půda vhodná pro aspergily, penicilia a scopulariosis.
- RÝŽOVÝ NEBO KUKUŘIČNÝ AGAR – hodnotíme charakter mycelia a tvorbu charakteristických morfologických útvarů (např. chlamydospor u *C. albicans*)
- PŮDA PRO SUBKULTURY *Pityrosporum orbiculare* a *P. ovale*

- CHROMOGENNÍ MÉDIA např. HardyCHROM[™] Candida je selektivní médium doporučené pro izolaci a identifikaci kvasinek. Toto médium umožňuje rozlišení *C. albicans*, *C. tropicalis* a *C. krusei*, založené na rozdílech v morfologii a barvě kolonií. Toto médium usnadňuje detekci smíšených kultur kvasinek (www.hardydiagnostics.com).

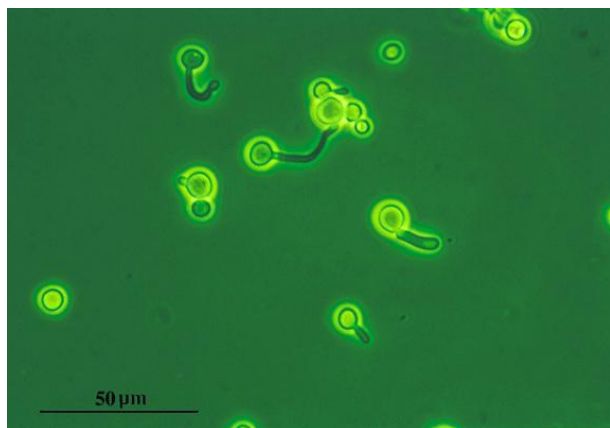


Obr. 16 CHROMagar *Candida* ukazující různé barevné rozlišení kvasinek na chromogenním médiu *C. albicans* (zelená), *C. tropicalis* (modrá), *C. parapsilosis* (bílá) a *C. glabrata* (růžová).

<http://www.hardydiagnostics.com/catalog2/hugo/HardyCHROMCandida.html>

3.5.2.2 Současná laboratorní diagnostika kvasinek

- TEST INDUKCE TVORBY KLÍČNÍCH HYF – je základním důkazem *Candida albicans*. Je založen na tvorbě tzv. germ tubes, tj. zahájení růstu hyfy z původně oválné kvasinkovité buňky po tříhodinové inkubaci suspenze buněk v čerstvém koňském séru (pozn. autora: v současné době se spíše používá bovinní sérum nebo syntetická média) při 37°C (Janderová, 1999).

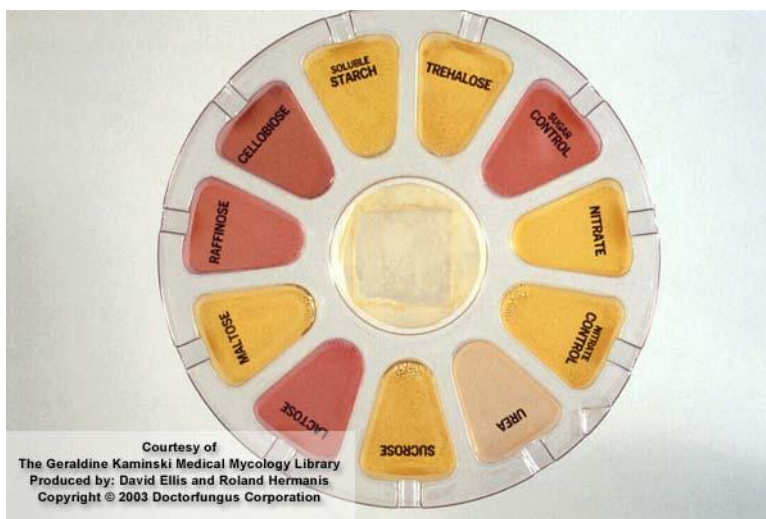


Obr. 17 Germ tube test (test indukce tvorby klíčních hyf), identifikace *C.*

albicans. Produkce tzv. germ tubes *C. albicans* v plazmě po 2-3 h. inkubaci při 37°C.

<http://www.mycology.adelaide.edu.au/gallery/photos/candida26.html>

- HODNOCENÍ RŮSTU NA NUTRIČNĚ CHUDÝCH MÉDIÍCH – hodnotíme mikromorfologii kultur narostlých na kukuřičném či rýžovém agaru. Sledujeme přítomnost a uspořádání mycelia a tvorbu charakteristických morfologických útvarů např. chlamydospor u *C. albicans*.
- CUKERNÉ AUXANOGRAMY nám ukazují jaký cukr (nebo jiný zdroj uhlíku) je schopna kultura asimilovat. Po naočkování kultur na živnou půdu přiložíme na povrch agaru cukerné disky. Jestliže je kultura schopna látku asimilovat, projeví se růst mléčným zakalením v okolí disku. Odečítáme po 24 a 48 hodinách (Fragner, 1984).
- DUSÍKATÉ AUXANOGRAMY nám ukazují, který zdroj dusíku je kultura schopna asimilovat (Fragner, 1984).
- ZYMOGRAMY (zjišťování kvasných schopností) – používáme řady tekutých půd obsahujících různé cukry a acidobazický indikátor, odečítáme po 24 a 48 hodinách a sledujeme změnu barvy půdy (Fragner, 1984).



Obr. 18 Uni-yeast-Tek znázorňující různé zkoušky schopnosti asimilace. Deska používaná pro identifikaci kvasinek.

http://www.doctorfungus.org/imageban/index_enlarge.pl

3.5.3 NEKULTIVAČNÍ METODY (www.detskaonkologie.cz)

- ANTIGENY BUNĚČNÉ STĚNY
 - Galaktomannan – polysacharid aspergilů a některých dalších vláknitých hub (*Penicillium* spp., *Paecilomyces* spp., *Alternaria* spp.). Slouží k detekci invazivní aspergilózy a to dvěma metodami s různou citlivostí – latexová aglutinace (Pastorex® Aspergillus) a ELISA (Platelia® Aspergillus). Některá betalaktámová antibiotika způsobují falešnou pozitivitu ELISA testu (Tazocin®, Augmentin®, Ampicilin Pliva®), proto je nutno jednotlivé šarže používaných antibiotik předem testovat.
 - Mannan – tvoří cca 40% polysacharidů buněčné stěny kvasinek, slouží k detekci invazivní kandidózy a to dvěma metodami s různou citlivostí – latexová aglutinace (Pastorex® kandida) a ELISA (Platelia® Candida Ag)
 - Glykuronoxylomannan – detekuje se latexovou aglutinací (Parotex® Crypto Plus)

- (1,3)- β -D-Glukan – hlavní polysacharid buněčné stěny hub, který je na rozdíl od galaktomannanu integrální součástí skletu buněčné stěny, slouží k detekci invazivní mykózy. Existují dva komerční sety využívající amébocyty ostrorepa Glucatell®/ Fungitell® (Associates of Cape Cod), Fungitec-G glukán detection test (Seikagaku)
- PROTILÁTKY
 - Antimannan – používá se v kombinaci s detekcí mannanu, což zvyšuje senzitivitu testu. Prokazují se obvykle Ouchterlonyho dvojitou imunodifúzí.

3.6 LÉČBA HOUBOVÝCH INFEKČÍ

K léčbě se užívá ve srovnání s antibakteriálními látkami poměrně málo antimykotik. Je to proto, že lidské buňky i buňky hub jsou eukaryotní a že většina látek, jež má smrtící účinek na patogenní houby, je pro hostitele toxická. Proto téměř všechna antimykotika využívají rozdílnost sterolů buněčné membrány hub. Většina antimykotik je určena k lokálnímu použití a jen některá se používají celkově. Při některých systémových infekcích je vhodná kombinace antimykotik (např. při kombinaci nefrotoxického amfotericinu B a flucytosinu, lze amfotericin podávat v nižší dávce a snížit tak pravděpodobnost vzniku rezistence k flucytosinu) (Greenwood, 1999). Incidence i závažnost mykóz v posledních letech dramaticky vzrostla, zejména následkem pokroků v chirurgii, v terapii zhoubných nádorů a v kritické péči provázené zvýšeným používáním antibiotik se širokým spektrem účinku i důsledkem epidemie HIV. Tyto změny vyvolaly zvýšení počtu pacientů ohrožených houbovými infekcemi. Farmakoterapii mykóz revolučně ovlivnilo zavedení relativně netoxických perorálních azolových derivátů. Bohužel se objevily azolrezistentní houby, to přineslo nové úkoly. Slibné se zdají dvě nové třídy antimykotik, analogy echinokandinu a nikkomyciny. Antimykotika dostupná v současné době se dělí na několik skupin: celkově (perorálně nebo parenterálně) podávaná antimykotika pro terapii systémových infekcí; perorálně podávaná antimykotika pro terapii mukokutánních infekcí a lokálně podávaná antimykotika pro terapii mukokutánních infekcí (Katzung, 2001). Pro klasifikaci

antimykotik je nejvýhodnější rozdělení podle chemické struktury, které zahrnuje základní klinický pohled z hlediska účinku a podle způsobu podání.

3.6.1 ANTIMYKOTICKÁ ANTIBIOTIKA

3.6.1.1 Polyenová antimykotika

Amfotericin B (AMPHOCIL i.v. inj., inj. sic., AMPHOTERICIN B SQUIBB, komplex s lipidy ABELCET inj. sic.)

Amfotericin B je antifungální antibiotikum vyrobené z produktů *Streptomyces nodosus*.

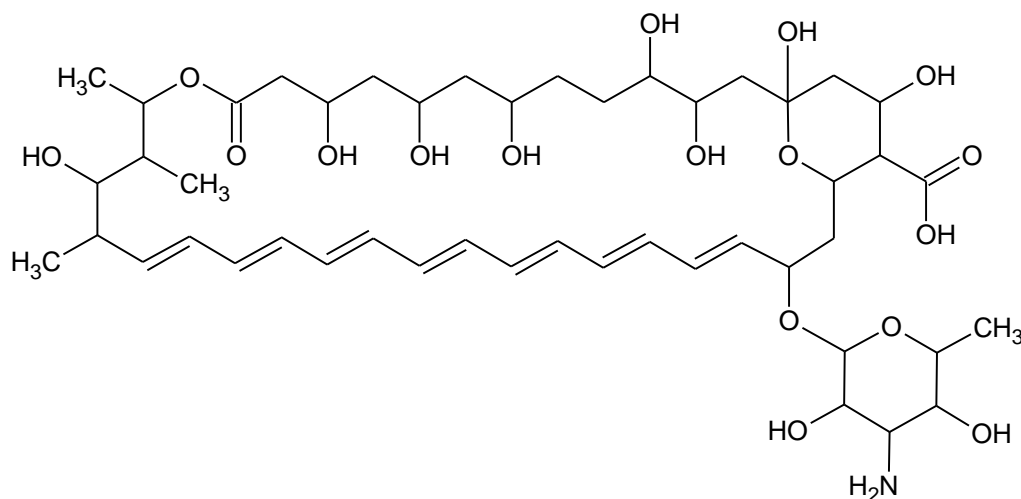
Jedná se o makrolidové polyenové antimykotikum se systémovým účinkem. Je téměř nerozpustné ve vodě, a proto se připravuje jako koloidní suspenze amfotericinu B a deoxycholátu sodného pro intravenózní injekci (Katzung, 2001). Je dostupný i v přípravcích na tukovém nosiči, jejichž farmakokineticko-farmakodynamické vlastnosti jsou klinicky výhodnější. Je dosud nejúčinnějším antimykotikem s nejširším spektrem účinku a nejmenším výskytem rezistencí. Je lékem volby u infekcí aspergilových a mukormykózy (Lincová, 2007).

Mechanismus účinku: amfotericin má selektivní fungicidní účinek, protože využívá rozdílů lipidového složení buněčných membrán hub a savců. Sterol buněčné membrány hub ergosterol se vyskytuje v buněčné membráně hub, zatímco převažující sterol u bakterií a člověka je cholesterol. Amfotericin se váže na ergosterol a porušuje permeabilitu buňky tím, že vytváří v buněčné membráně póry (Katzung, 2001).

Farmakokinetika: amfotericin se po perorálním podání nevstřebává, vysoce se váže na plazmatické bílkoviny a jeho distribuční objem je obrovský, což souvisí rovněž vysokou vazbou na membránové struktury (cholesterol). Špatně proniká do hůře prokrvených tkání a tělesných tekutin. Močí se vylučuje velmi málo, takže zhoršení renálních funkcí plazmatickou hladinu neovlivní. Amfotericin nelze odstranit hemodialýzou.

Nežádoucí účinky: jsou jednak akutní a jednak chronické. Z akutních nežádoucích příznaků je to horečka, třesavka, rigor, nauzea a zvracení, bolesti hlavy, svalstva a kloubů, koliky, průjem a alergické reakce. Chronické nežádoucí účinky představují především projevy nefrotoxicity s následnou elektrolytovou dysbalancí.

Klinické použití: používá se u nemocných s mykotickými infekcemi, jestliže vyvolávající agens je citlivé na jeho účinky a infekce je progresivní a potenciálně život ohrožující. Profylakticky se podává nemocným převážně po protinádorové léčbě, s horečkami a granulocytopenií, kteří jsou léčeni širokospektrými antibiotiky a pacientům po transplantaci orgánu – jater, srdce a kostní dřeně (Lincová, 2007).



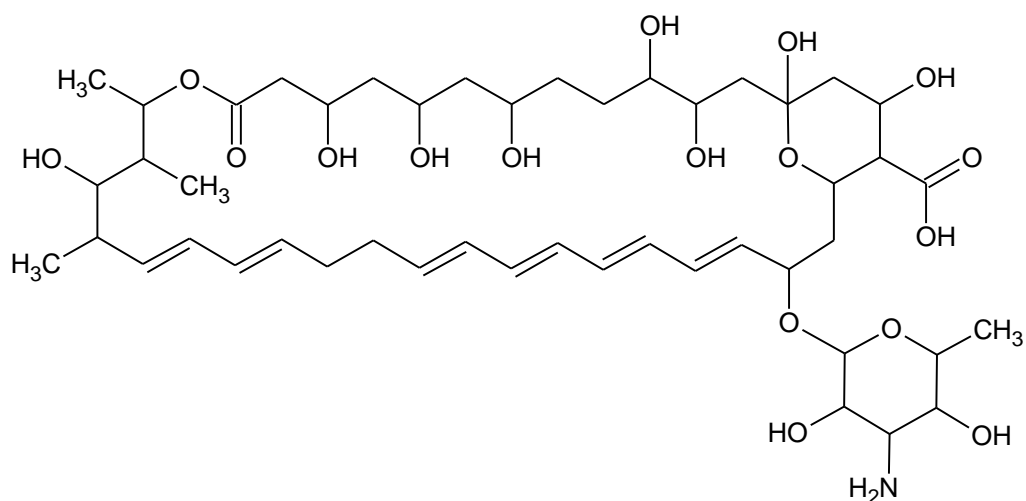
Obr. 19 Amfotericin B

Nystatin (FUNGICIDIN Léčiva ung., MULTILIND ung., liposomální léková forma NYOTRAN)

Lokální polyenové antibiotikum s fungicidním a fungistatickým účinkem produkované kmenem *Streptomyces noursei*, má stejný mechanismus účinku jako amfotericin B tj. vytváří v membráně póry (Katzung, 2001).

Do spektra účinku patří hlavně kvasinkové mikroorganismy rodů: *Candida*, *Rhodotorula*, *Torulopsis*, *Trichosporon*. Dobře působí na mikromycety rodu *Aspergillus*. Nystatin je indikován u povrchních kandidóz (anální, interdigitální, inguinální, axilární, intramamární, a jiné intertriginózní kandidózy, kandidové paronychie) (Lincová, 2007).

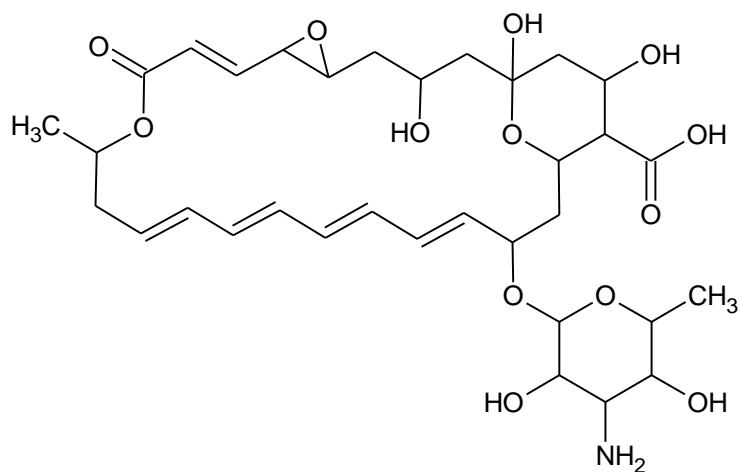
Nystatin se významnější měrou neadsorbuje z kůže, sliznic ani z trávicího ústrojí, proto je jeho toxicita málo významná. Nepříjemná chuť mimoto ještě často limituje jeho perorální použití (Katzung, 2001).



Obr.20 Nystatin

Natamycin (PIMAFUCIN crm., liq., PIMAFUCORT ung., crm., lot.)

Je lokální polyenové antimykotikum izolované z aktinomycety *Streptomyces natalensis*. Mechanismus fungistatického účinku spočívá ve vazbě na membránu hub. Působí na širokém spektru hub (kvasinky, dermatofyta, plísně, bifázické houby), ale terapeuticky lze využít účinek proti kandidám a *Trichomonas vaginalis*. Je indikován u kandidózy ústních koutků, kandidové vulvitidy a balanitidy, erosio interdigitalis a intertrigo candidomycetica, kandidové paronychie a onychomykózy (Lincová, 2007).

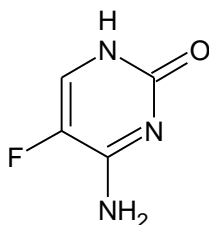


Obr. 21 Natamycin

3.6.2 ANTIMETABOLITY

Flucytosin (ANCOTIL Roche tbl., inj.)

Je systémové antimykotikum s úzkým spektrem účinku, které je jediným zástupcem antimetabolitů. Do buňky mikromycet je transportován aktivně (*cytosinpermeasa*), kde je deaminován na 5-fluoruracil a pak je inkorporován do RNA s výslednou inhibicí syntézy nukleových kyselin (Lincová, 2007). Původně byl vyvinut v 50. letech jako potencionální antineoplastikum, později se zjistilo, že neúčinkuje na nádorové buňky, ale inhibuje citlivé kmeny *Aspergillus*, *Candida*, *Cladosporium* a *Cryptococcus* (Hartl, 1992). V monoterapii je indikován jen výjimečně (vzhledem k rychlému vývoji sekundární rezistence) při chromomykóze a ke krátkodobé léčbě mykotických infekcí močových cest. V kombinaci (s amfotericinem B nebo azolovými antimykotiky) se využívá k terapii orgánové kandidózy, kryptokokózy (i nitrolební), blastomykózy a další. Z nežádoucích účinků je nejzávažnější granulocytopenie, přechodné zvýšení jaterních testů, dále projevy intolerance především ze strany trávicího ústrojí (Lincová, 2007).



Obr. 22 Flucytosin

3.6.3 AZOLOVÁ ANTIMYKOTIKA

3.6.3.1 Systémová azolová antimykotika

Azolová antimykotika jsou syntetické látky, které představují jednak starší imidazoly (mikonazol, ketokonazol), jednak novější triazoly (flukonazol, itraconazol a další).

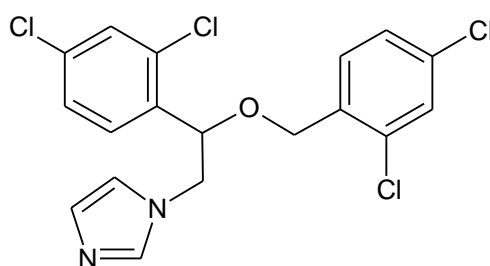
Mechanismus fungistatického účinku je společný a spočívá v inhibici enzymů konečné fáze ergosterolu v membráně hub. K inhibici konverze lanosterolu na ergosterol dochází prostřednictvím enzymu *C-14- α -demethylasy*, jejíž katalytická aktivita

je závislá na cytochromu P-450; jeho blokáda je klíčovým krokem účinku azolových antimykotik. Inhibicí syntézy membránových struktur azolová antimykotika blokují u dimorfních hub morfogenezi z kvasinkové do myceliální formy. Rezistence na azoly se postupně stává klinickým problémem, tak jak se zvyšuje používání této skupiny antimykotik v klinické praxi.

Klinicky se používají především u kandidových infekcí. S výjimkou itrakonazolu nejsou použitelná u aspergilózy, žádný z azolových derivátů není účinný vůči mukormykóze.

Mikonazol (KLION-D 100 vag.tbl.)

Nejstarší azolové antimykotikum, je nahrazováno novějšími deriváty. Mikonazol je širokospektré syntetické lipofilní imidazolové antimykotikum. Indikace mikonazolu jsou především systémové kandidózy (terapeuticky i profylakticky), kryptokokóza, dermatomykózy těžšího klinického průběhu a dále endemické mykózy, blastomykózy, histoplazmóza, kokcidioidomykóza, chromomykóza a nokardióza (Lincová, 2007).

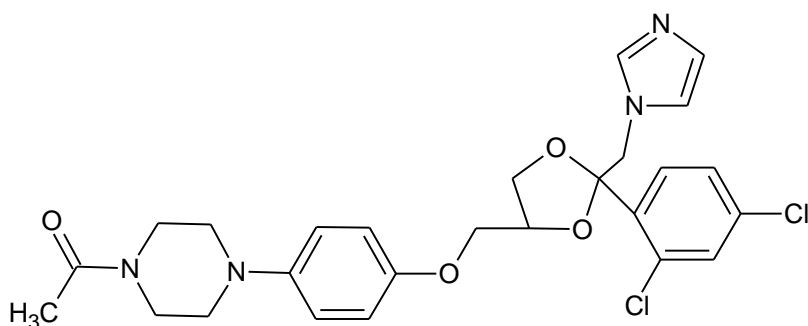


Obr. 23 Mikonazol

Ketokonazol (NIZORAL tbl., sus., shp., crm.)

První perorální azol zavedený do praxe (Katzung, 2001). Jedná se o širokospektré syntetické lipofilní imidazolové antimykotikum. Významně se akumuluje v kůži, kde přetrvává až 5 dní po vysazení léčby. Indikací ketokonazolu jsou především infekce kůže, vlasů a nehtů způsobené dermatofyty nebo kvasinkami (dermatofytóza, onychomykóza, kandidová perionyxitida, pytiriasis versicolor, pytiriasis capitis, folliculitis vyvolaná *Pytirosporum* spp., chronická mukokutánní kandidóza) za předpokladu, že tyto infekce nelze léčit topicky vzhledem k jejich lokalizaci, rozsahu nebo hloubce postižení kůže, popř. pokud zůstává topická léčba bez odezvy. Další

indikací jsou kvasinkové infekce gastrointestinálního traktu (Lincová, 2007). Od flukonazolu a itrakonazolu se liší větší schopností inhibovat savčí enzymy systému cytochromu P-450 a je pro cytochrom P-450 hub méně selektivní než novější azoly. Tato skutečnost má dva důsledky: za prvé, inhibice lidského cytochromu P-450 ketokonazolem interferuje s biosyntézou steroidních hormonů v kůře nadledvin a v gonádách, a vyvolává tak významné endokrinní příznaky, např. gynekomastii, neplodnost a nepravidelnost menstruačního cyklu. Za druhé, interakce s cytochromem P-450 může změnit metabolismus jiných látek, a tím zvýšit jejich toxicitu (Katzung, 2001).

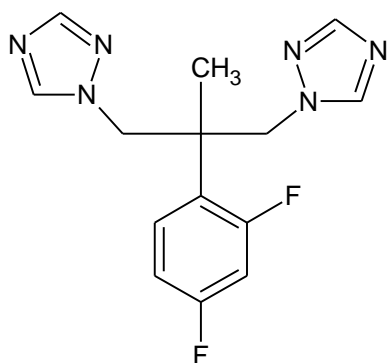


Obr. 24 Ketokonazol

Flukonazol (DIFLUCAN cps., MYCOMAX inf., sir.)

Novější systémové triazolové antimykotikum pro parenterální i perorální podání. Od ostatních antimykotik se liší farmakokinetikou (je hydrofilní), má nejvyšší terapeutický index (který umožňuje při různých mykózách agresivnější dávkování (Katzung, 2001), nejméně nežádoucích účinků a lékových interakcí (Lincová, 2007). Antimikrobiální spektrum zahrnuje *Candida* spp., které jsou citlivější, *Cryptococcus* spp., dermatofyty (*Microsporum* spp. a *Trichophyton* spp.), *Blastomyces dermatitis*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum* a další. Flukonazol je zcela neúčinný u aspergilózy a u zygomykózy. Nežádoucí účinky jsou většinou nezávažné dyspeptické obtíže, bolesti hlavy, potíže ze strany gastrointestinálního traktu (bolesti břicha, zvracení, průjem), dále kožní exantém a asymptomatické zvýšení ALT. Vzácně může dojít – nezávisle na dávce – k závažnému toxickému poškození jaterní buňky s rizikem letálního zakončení (Lincová, 2007). Flukonazol je azol volby při léčbě a sekundární profylaxi kryptokokové meningitidy. Ukázalo se, že intravenózně podaný flukonazol je

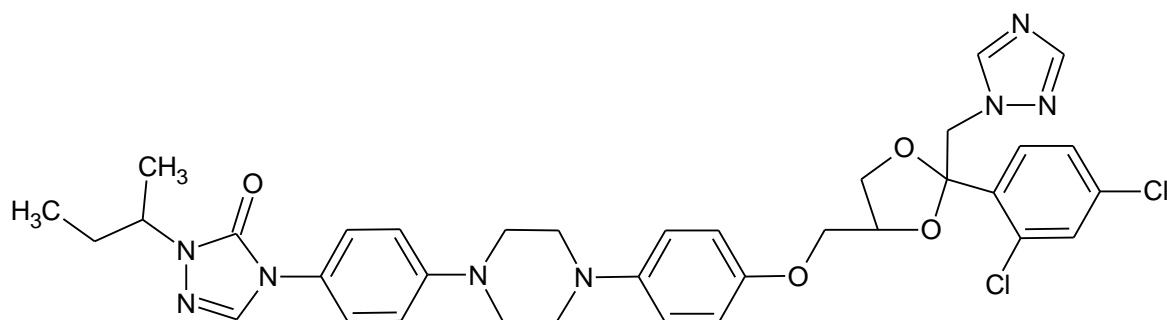
stejně účinný jako amfotericin B při léčení kandémie u pacientů s normálním počtem leukocytů (Katzung, 2001). Nejdůležitější klinické indikace jsou kandidózy systémové, kandémie, v útočné i udržovací léčbě u imunokomprimovaných nemocných, kryptokokózy (nitrolební, plicní, kožní), dermatomykózy (tinea pedis, tinea corporis, tinea cruris, onychomykózy), systémové endemické mykózy (kokcidiomykózy, parakokcidiomykóza, sporotrichózy, histoplazmóza) (Lincová, 2007).



Obr. 25 Flukonazol

Itrakonazol (SPORANOX cps., sol.)

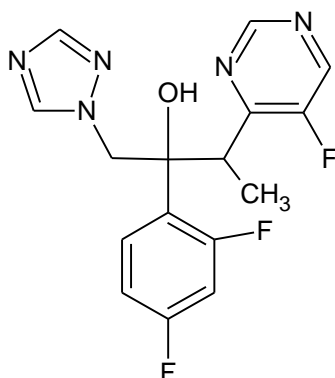
Systémové triazolové antimykotikum pro parenterální i perorální podání. Mechanismus účinku spočívá v inhibici syntézy ergosterolu (Lincová, 2007). Podobně jako u ketokonazolu se jeho absorpce zvyšuje příjmem potravy a při nízkém žaludečním pH. Itrakonazol neovlivňuje u savců syntézu steroidů a mnohem méně než ketokonazol ovlivňuje jaterní metabolismus jiných látek. Itrakonazol je z dostupných azolů nejúčinnější, snížená biologická dostupnost však může jeho účinnost limitovat. Itrakonazol je azol volby při terapii onemocnění vyvolaných dimorfními houbami a u onychomykóz. Itrakonazol proniká do místa infekce nehtového lůžka. Zde se hromadí a přetrvává v nehtových ploténkách po dlouhou dobu (6–9 měsíců). Vysoké procento vyléčení se vysvětluje právě jeho keratofilními vlastnostmi (Kellerová, 2007), uplatňuje se také při terapii vyvolanými histoplazmaty, blastomycetami, sporotrixy (Katzung, 2001). Je účinný i proti aspergilům avšak v této indikaci jde o látku druhé volby po amfotericinu (Lincová, 2007).



Obr. 26 Itrakonazol

Vorikonazol (VFEND inf. sic., tbl obd.)

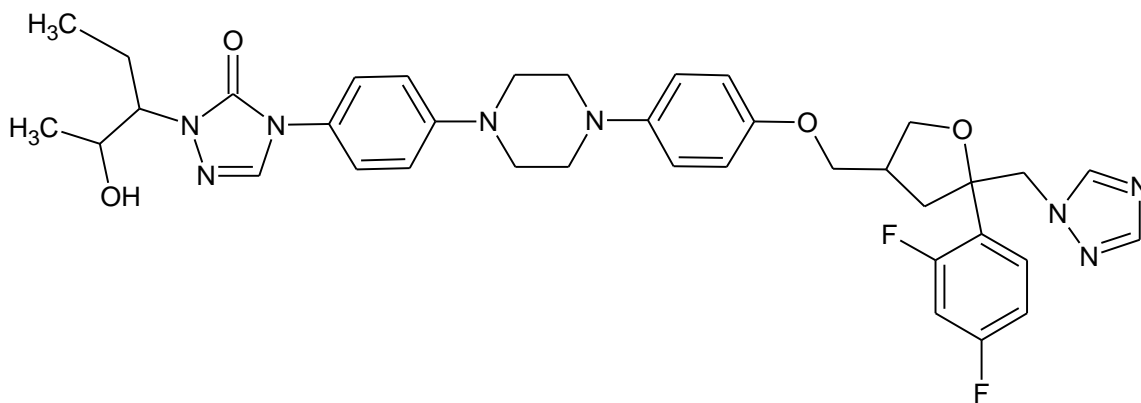
Nejnovější systémové antimykotikum, dostupné v perorální i parenterální formě, které se vyznačuje vysokou aktivitou na většinu kandid a fungicidním účinkem na aspergily. Je lékem volby u prokázaných aspergilových infekcí (Haber, 2007) a infekcí vyvolaných kandidami rezistentními na flukonazol (Lincová, 2007).



Obr. 27 Vorikonazol

Posakonazol (NOXAFIL sol.)

Představuje spolu s vorikonazolem druhou generaci triazolů se širokým spektrem účinku na kandidy, *Cryptococcus neoformans*, a vláknité houby, včetně *Aspergillus* spp., *Scedosporium* spp., a *Fusarium* spp. Posakonazol má v současné době ze všech azolových antimykotik nejširší spektrum účinku. Zkřížené rezistence s flukonazolem u kvasinek jsou málo časté a navíc jde o jedinný azol s klinickým účinkem na zygomycety (Ráčil, 2008).



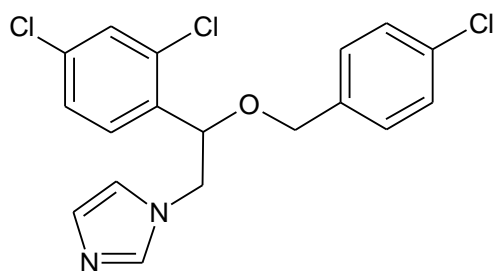
Obr. 28 Posakonazol

3.6.3.2 Lokální azolová antimykotika

Jedná se o syntetické látky, které představují skupinu látek s podobným mechanismem účinku, podobnými farmakokinetickými i farmakodynamickými účinky a tedy i obdobným klinickým použitím. Jde o důležitá dermatologika, resp. gynekologika.

Ekonazol (PEVARYL crm.,pst., liq., spr., lot.)

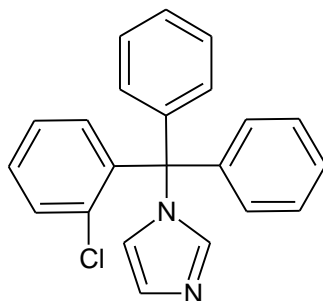
Obdobně jako ostatní azolová antimykotika – blokuje syntézu ergosterolu vazbou na cytochrom P-450. Alteruje tak permeabilitu buněčné stěny citlivých mikroorganismů a dochází k akumulaci toxických peroxidů. Působí fungistaticky až fungicidně na proliferující houby, kvasinky a plísň. Účinkuje také na bakteriostaticky na většinu grampozitivních bakterií, včetně *Propionibacterium acnes*. Primárně rezistentní kmeny jsou vzácné, sekundárně odolné kmeny se vyvíjejí pomalu. Ekonazol je nedráždivý. Indikací ekonazolu jsou především dermatomykózy vyvolané dermatofyty (trichofycie, epidermofycie, mikrosporíe), kvasinkami (kandidózy), fakultativně patogenními houbami i plísněmi, dále smíšené bakteriální a mykotické infekce vyvolané dermatofyty nebo kvasinkami v kombinaci se streptokoky, stafylokoky, nokardiemi, také pityriasis versicolor a erytrazma (Lincová, 2007).



Obr. 29 Ekonazol

Klotrimazol (CANESTEN crm., liq., AKNECOLOR, CANDIBENE spr., crm.)

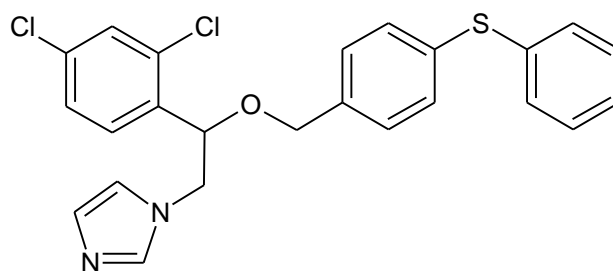
Lokální azolové antimykotikum, jehož mechanismus účinku je obdobný jako u ekonazolu. Působí fungistaticky až fungicidně na proliferující houby, kvasinky a plísňe, bakteriostaticky na většinu grampozitivních bakterií, včetně *Propionibacterium acnes*. Primárně rezistentní kmeny jsou vzácné, odolné kmeny se vyvíjejí pomalu. Indikací klotrimazolu jsou dermatofytózy, kandidózy a keratomykózy (pytiriasis versicolor), interdigitální mykózy, paronychie, balanitidy a vulvitidy. Po vymizení klinických příznaků a subjektivních potíží je třeba pokračovat v léčbě, aby se zabránilo recidivám, průměrná léčba je 2–4 týdny (Lincová, 2007).



Obr. 30 Klotrimazol

Fentikonazol (LOMEXIN crm.vag., tbl.vag.)

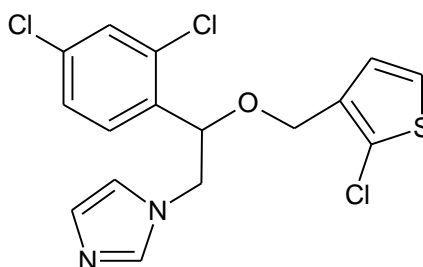
Lokální azolové antimykotikum s vlastnostmi obdobnými jako u ostatních lokálních azolových antimykotik (Lincová, 2007).



Obr. 31 Fentikonazol

Tioconazol, Oxiconazol, Terconazol

Lokální azolová antimykotika výlučně určená k léčbě kandidových vulvovaginitid (Lincová, 2007).



Obr. 32 Tiokonazol

3.6.4 ECHINOKANDINY

Chemicky jde o lipopeptidy o velké molekulové hmotnosti kolem 1200 kD se zcela odlišným mechanismem účinku od ostatních skupin antimykotik, cestou biotransformace mimo enzymatický systém cytochromu P-450, což jednak umožňuje jejich použití v kombinaci prakticky se všemi ostatními antimykotiky a jednak s tím souvisí i minimum lékových interakcí (Hartl, 1992). Mechanismus účinku spočívá v inhibici fungální β -(1,3)-glukan syntetázy, což vede k depleci glukanu v buněčné stěně, její osmotické nestabilitě a lýze buňky (Rozsypal, 2008). Skutečnost, že cílové místo působení echinokandidů není přítomno v buňce savců je vysvětlením pro minimální toxicitu této lékové skupiny (Ráčil, 2008).

Kaspofungin (CANCIDAS i.v. inj.)(www.cancidas.com)

Spektrum účinku je široké, vedle kandid a aspergilů je účinný i na *Saccharomyces cerevisiae* a na cysty *Pneumocystis jiroveci*, není účinný proti kryptokokům. Echinokandiny brání kandidám v tvorbě biofilmu na umělém povrchu. Mají dlouhý postantifungální efekt (5-6 hodin) po jednohodinové expozici. Lék je velmi dobře snášen, rovněž interakce nejsou významné. Kaspofungin se zařadil k lékům první volby v léčbě invazivní kandidózy a kandidémie (Rozsypal, 2008).

Anidulafungin (ECALTA), Micafungin (MYCAMINE)

Oba se vyznačují účinností na kmeny kandid a aspergilů, naopak jsou neúčinné při infekci vyvolaných *Cryptococcus neoformans* a jinými vláknitými houbami krom *Aspergillus* spp. (Ráčil, 2008). Anidulafungin rozšířil paletu echinokandinů a v rámci této skupiny i indikaci 1. volby u nemocných s invazivní kandidózou a kandidemií. Je indikován zejména při středně těžkých a těžkých infekcích u hemodynamicky nestabilních pacientů bez neutropenie nebo v klinickém stavu, který hrozí zhoršením (Haber, 2008).

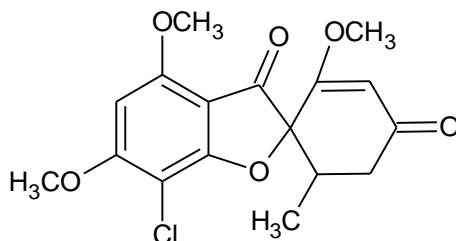
3.6.3.2 OSTATNÍ ANTIMYKOTIKA

Griseofulvin (FULCIN tbl., GRISOVIN tbl.)

Benzofuranové, lipofilní antibiotikum s antimykotickým účinkem na dermatofyty. Získává se z kmenů *Penicillium griseofulvum*, *Penicillium patulum*.

Mechanismus účinku spočívá v denaturaci proteinového cytoskeletu (mikrotubulárního aparátu buňky), po jehož dezintegraci se buňka nemůže dělit (tzv. mikrotubulární jed). Funkčně jde o inhibici proteosyntézy a syntézy mRNA a zejména narušení výstavby buněčné stěny, morfologicky pak o blokádu proliferace vláknitých výběžků, hyf. Antimikrobiální spektrum je úzké, působí pouze na dermatofyty (*Epidermophyton*, *Trichophyton*, *Microsporum*), není účinný na kandidy, aspergily, aktinomycety ani bakterie. Rezistence vzniká vzácně, není zkřížená s jinými antimykotiky. Griseofulvin vykazuje zkříženou alergii s penicilinem! Není vhodný u jaterní léze, porfyrie, systémového lupus erythematoses, v těhotenství, během laktace a

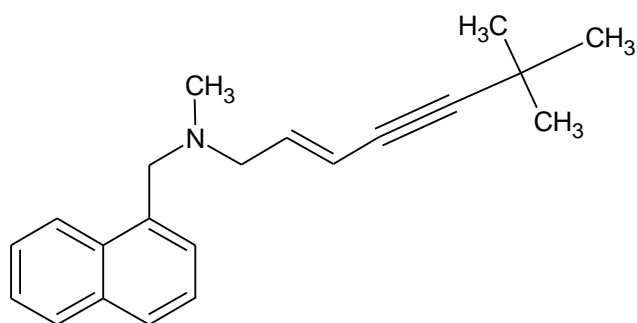
u novorozenců. Muži by měli oddálit početí během terapie a ještě alespoň 6 měsíců po ní. Nežádoucí účinky nejsou časté ani vážnějšího rázu.



Obr. 33 Griseofulvin

Terbinafin (LAMISIL gel)

Allylaminové antimykotikum analogu naftifinu. Blokuje syntézu ergosterolu inhibicí aktivity skvalenepoxidasy, na rozdíl od azolových antimykotik neinhibuje procesy závislé na cytochromu P-450 a nesnižuje tedy hladiny steroidních hormonů. Fungicidní účinek je způsoben inhibicí enzymatické aktivity a intracelulární akumulací skvalenů, vlastní nedostatek ergosterolu pro stavbu buněčné stěny se na antimykotickém efektu podílí fungistaticky. Antimikrobiální spektrum zahrnuje dermatofyty (*Trichophyton spp.*, *Microsporum spp.*, *Epidermophyton floccosum*), kvasinky (*Candida spp.*, *Pityrosporum spp.*, *Scopulariopsis brevicaulis*), plísňe (*Aspergillus spp.*), dimorfní houby (*Sporothrix schenckii*, *Blastomyces dermatitidis*, *Histoplasma capsulatum*) a Dematiaceae spp. (*Hendersonula toruloidea*) a parazity (epimastigoty i amastigoty, *Trypanosoma cruzii*). Terbinafin je vysoce lipofilní a keratofilní a postupně se koncentruje v tukové tkáni, v kůži (ve stratum corneum již druhý den po podání dosahuje 10x vyšších koncentrací než v plazmě) a jejích adnexech (vlasový folikul, vlas) v nehtech (za 3 týdny již lze prokázat v odstřiženém nehtu) a sebu, nikoliv v potu. Poločas eliminace z tkání je 4-5 dní se zachováním, fungicidních koncentrací vůči dermatofytům ještě 3 týdny po léčbě. Na podkladě interakce vykazuje terbinafin synergický účinek s ketokonazolem (až 30násobné zvýšení) při infekcích způsobených *Trypanosoma cruzii*, potencuje účinek triazolových antimykotik. Terbinafin může být použit především k léčbě dermatofytózy, aspergilózy a akauliózy (*Scopulariopsis brevicaulis*) nehtu, kandidová onychomykóza mezi jeho indikace nepatří (Skořepová, 2007).



Obr. 34 Terbinafin

3.7 TESTOVÁNÍ ANTIMYKOTICKÉ ÚČINNOSTI *IN VITRO*

Laboratorní sledování citlivosti původců mykóz k antimykotikům se v současné době stává nezbytností z několika důvodů. Jedním z nich je skutečnost, že spolu se vzestupem výskytu mykotických onemocnění dochází ke zintenzivnění snah po rozšíření palety antifungálních látek a vzniká potřeba porovnání jejich účinku ještě před klinickým použitím. Dalším důvodem je zjevný výskyt rezistentních kmenů některých hub, nutící ošetřujícího lékaře k výběru preparátu, který si zachoval *in vitro* účinnost. Laboratorní testování citlivosti umožňuje také racionálnější přístup k léčbě mykóz v tom smyslu, že vede ošetřujícího lékaře k diferencovanému, často výrazně zvýšenému dávkování systémových antimykotik. U onemocnění, jejichž původci jsou k danému preparátu *in vitro* jen slabě citliví – např. některé kvasinky ke ketokonazolu - je zdůvodněno použití 2-3 násobných dávek léku. V těchto případech se mohou hranice mezi účinností a toxicitou velmi přibližovat. Při hodnocení významu testování antimykotik *in vitro* však na druhé straně platí stejná omezení jako při testování látek antibakteriálních. Získané výsledky vždy vedou jen k relativním, nikoliv absolutním závěrům o klinické použitelnosti daného preparátu. Stejně jako u bakteriálních infekcí, nemůže ani u mykóz laboratorní model napodobit složitost klinické situace, ovlivňované mnoha faktory a probíhající v řadě variací (Otčenášek, 1990).

3.7.1. DIFÚZNÍ DISKOVÁ METODA

Tato metoda stanovuje citlivost, resp. rezistenci agens podle velikosti zóny růstové inhibice disků obsahujících určité koncentrace antimykotik. Metoda je vhodná jako orientační nebo vyhledávací test k posouzení polyenů, azolů, 5-fluorocytosinu i dalších antifungálních látek. Výhodou je snadnost, rychlost provedení a nevýhodou je ne zcela přesná interpretace výsledků, ovlivňovaná různým koncentračním spádem antimykotik v agaru, způsobená variabilní rozpustností, schopností difúze a stabilitou těchto látek (Otčenášek, 1990).

Principem diskového difúzního testu je měření průměru inhibiční zóny kolem disku nasyceného určitou koncentrací antimykotika. Tato zóna je úměrná citlivosti daného kmene mikroba k antimykotiku a lze díky ní zařadit mikroba do kategorie citlivý, intermediálně citlivý nebo rezistentní (Votava, 2005).

3.7.2 TESTY STANOVENÍ MINIMÁLNÍ INHIBIČNÍ KONCENTRACE

Tyto testy umožňují kvantitativní posouzení citlivosti a poskytují výsledky použitelné nejen pro výběr vhodného antimykotika, ale i pro určení optimálních léčebných dávek. Jsou-li prováděny v tekutých médiích, je jejich předností možnost stanovení minimální fungicidní koncentrace, další výhodou je dosažení homogenní suspenze antimykotik a získání vysoce přesných hranic jednotlivých koncentrací. Nevýhodou je pracnost těchto testů a možnost odečítání chybného výsledku při použití nestandardního inokula, při závadách v dodržení inkubačních teplot apod. Jako minimální inhibiční koncentrace (MIC) je označována koncentrace, vedoucí k makroskopicky zjištěné inhibici růstu testovaného organismu. Minimální fungicidní koncentrace (MFC) je koncentrace, při které dochází k devitalizaci tohoto organismu (Otčenášek, 1990).

3.7.2.1 Zkumavková diluční metoda (bujónová diluce)

Inhibice růstu testované houby se sleduje ve zkumavkách s tekutým médiem obsahujícím koncentrační řadu antimykotika. Jako MIC se hodnotí nejnižší koncentrace antimykotika, při které nedochází k makroskopicky pozorovanému růstu. Protože u některých preparátů dochází při určité koncentraci pouze k částečné růstové inhibici a

hranice pro odečítání jsou neostře, je třeba ze srovnání s růstem organismu v kontrolní zkumavce, neobsahující antimykotikum (Otčenášek, 1990).

3.7.2.2 Diluční mikrometoda

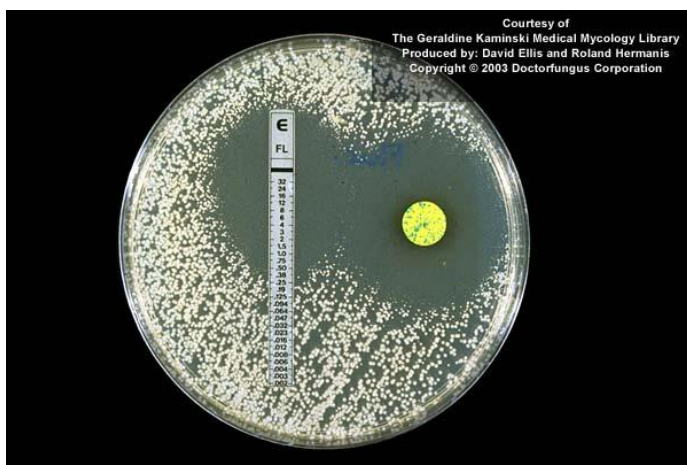
Tato metoda umožňuje rutinní stanovení MIC u většího počtu antimykotik a v celých souborech kmenů. Její hlavní výhodou je snížení finančních nákladů na kultivační půdy i na antimykotika, jednoduchost a vysoká standardnost provedení. Další výhodou je možnost automatizace. Hodnotu MIC určuje první jamka (v pořadí stoupajících koncentrací), ve které není zaznamenán růst (Otčenášek, 1990).

3.7.2.3 Agarová diluční metoda (plotnová modifikace)

Tato metoda je precizní, ale pracná a málo úsporná, nehodící se pro rutinní testování. Její výhodou je snadnost odečítání, nevýhodou nemožnost stanovení MFC a určitá závislost výsledku na rozpustnosti a disperzitě antimykotika v agaru, ve kterém nedochází k takovému kontaktu částic jako v bujónu. Metoda má své oprávnění v testování azolových chemoterapeutik, kde u bujónové modifikace je odečítání hodnoty MIC komplikováno neostrými hranicemi neinhibovaného růstu a úplné inhibice. Schopnost růstu se hodnotí v řadě Petrino misek obsahujících agarovou půdu s odstupňovanými koncentracemi antimykotika. Jako kontrola se považuje standardní kmen o známé citlivosti (Otčenášek, 1990).

3.7.2.4 Agarová difuzní metoda – E-test

Jedná se o jednodušší, ale nákladnější metodu stanovení MIC. Jde o proužek nasycený antimikrobiální látkou ve stoupající koncentraci, její hodnoty jsou na proužku vyznačeny. Proužek se klade na misku očkovanou jako na diskový difúzní test. Výsledná inhibiční zóna má vejčitý tvar, v místě kde její okraj protíná okraj proužku, odečte se na vytištěné škále hodnota MIC (Votava, 2005).



Obr. 35 Fluconazole Etest a disk test pro *Candida albicans*

http://www.doctorfungus.org/imageban/index_enlarge.pl

3.7.3 TEST STANOVENÍ MFC

Koncentrace antimykotika potřebná k usmrcení testovaných agens se zjišťuje vyočkováním obsahu zkumavek, použitých v diluční metodě stanovení MIC: vyočkovávají se zkumavky bez zjevného růstu houby. Při užití mikrometody se subkultivace provádí stejně, vyočkovává se z jamek destičky, ve kterých došlo k růstové inhibici. Test tedy přímo navazuje na předchozí stanovení fungistatického účinku antimykotika zkumavkovou diluční metodou (modifikace bujónem) nebo diluční mikrometodou. Mírou citlivosti je v tomto případě MFC, udávající nejmenší množství antimykotika, které je schopno v daném objemu kultivační půdy usmrtit exponovanou houbu (Otčenášek, 1990).

3.7.4 TEST STANOVENÍ POLOVIČNÍ RŮSTOVÉ RYCHLOSTI

Tento test je vhodný pro houby s myceliárními koloniemi, osvědčil se při sledování většího souboru kmenů. Inokulum, odebrané z mycelia testovaného kmene se očkuje do středu misek, ve kterých je rozlita vzestupně řada koncentrací antifungální látky v agarovém médiu. Mírou účinnosti látky je taková koncentrace, která zpomalí růst kolonie na 50% (Otčenášek, 1990).

3.7.5 TEST KLÍČIVOSTI SPÓR

Poměrně přesná a citlivá metoda. K suspenzi spór v živném médiu se přidává látka ve vzestupné řadě koncentrací, tato kapka se umístí na upravené podložní sklo, po 24h. kultivaci, zjišťujeme závislost mezi koncentrací a procentem klíčivosti spór (Otčenášek, 1990).

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 SCHÉMA POKUSU

Pro testování potencionální antifungální aktivity látek, připravených na Katedře anorganické a organické chemie a Katedře farmaceutické chemie a kontroly léčiv naší fakulty, byla použita mikrodiluční bujónová metoda. Tato metoda umožňuje rutinní stanovení MIC u většího počtu antimykotik a v celých souborech kmenů. Celý pokus je možno rozdělit do několika etap:

- PŘÍPRAVA RŮSTOVÉHO MÉDIA
- PŘÍPRAVA SUSPENZÍ TESTOVANÝCH KMENŮ HUB
- PŘÍPRAVA ŘEDÍCÍ ŘADY TESTOVANÉ LÁTKY
- PIPETOVÁNÍ DO MIKRODESTIČKY
- VYHODNOCENÍ

MATERIÁL

- PŘÍSTROJE – laminární box, termostat, mikroskop, vortex
- POMŮCKY – sterilní mikrotitrační destičky s víčky, mikropipety, sterilní špičky, 12ti jamkový rezervoár na médium, sterilní zkumavky, stojánky na zkumavky, očkovací kličky, Bürkerovy komůrky
- CHEMIKÁLIE
 - RPMI 1640 (5x koncentrované definované růstové médium obsahuje hydrouhličitanu pufrační systém a množství aminokyselin a vitamínů) (kompletní složení RPMI 1640 viz. Příloha č.2)
 - MOPS - 3-(N-morfolino)propansulfonová kyselina
 - DMSO - dimethylsulfoxid
 - NaOH – hydroxid sodný
 - Sterilní voda

- TESTOVACÍ KMENY KVASINEK A VLÁKNITÝCH HUB

- *Candida albicans* **CA** ATCC 44859
- *Candida tropicalis* **CT** 156
- *Candida krusei* **CK** E28
- *Candida glabrata* **CG** 20/I
- *Trichosporon beigelii* **TB** 1188
- *Aspergillus fumigatus* **AF** 231
- *Absidia corymbifera* **AC** 272
- *Trichophyton mentagrophytes* **TM** 445

4.2 METODIKA

4.2.1 PŘÍPRAVA RŮSTOVÉHO MÉDIA

Ke 4 dílům MOPS s 1% glukózy přidáme 1 díl RPMI 1640, celkový objem záleží na spotřebě, resp. na počtu testovaných kmenů, následně upravíme pH do rozmezí 6,5-7,9 přidávkem několika kapek NaOH (původně žlutý roztok změní barvu na oranžovo-červenou).

4.2.2 PŘÍPRAVA SUSPENZÍ TESTOVANÝCH KMENŮ HUB

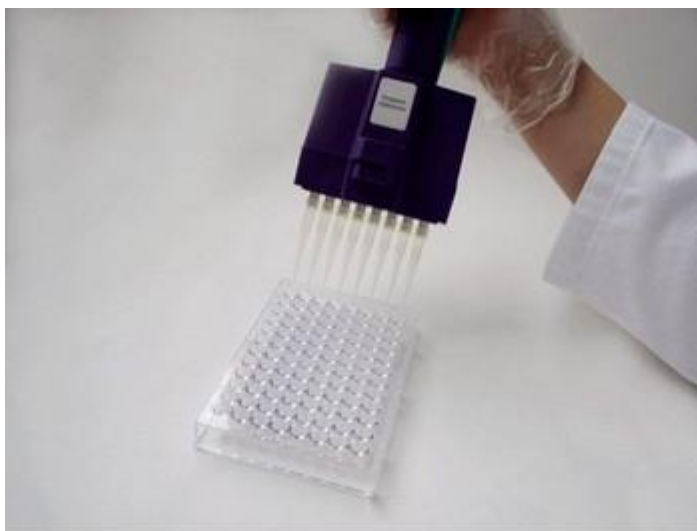
Z kultur kvasinek (vláknitých hub) narostlých na Sabouraudově glukózovém agaru odebereme malou část kolonie a resuspendujeme ji do sterilní vody ve zkumavce (každá zkumavka je přesně označena typem houby a obsahuje 3ml vody). Promícháme na vortexu a 12μl suspenze napipetujeme do Bürkerovy komůrky. Stanovíme počet buněk na 50 čtverců. Hustota inokula u kvasinek je $1,0-2,5 \times 10^5$ cfu/ml, což odpovídá 25-50cfu/50 čtverců. U vláknitých hub by měla být hustota 100 buněk na 50 čtverců. Takto připravená inokula hub vydrží v lednici 14 dní.

4.2.3 PŘÍPRAVA ŘEDÍCÍ ŘADY TESTOVANÉ LÁTKY

Testovaná látka musí být dodána s informací o navážce a molekulové hmotnosti, navážku rozpustíme v příslušném objemu DMSO (viz. příloha č.1) tak, aby 1. testovaná koncentrace byla 500 μ mol/l a zároveň koncentrace v jamce nepřesáhla 1%, promícháme na vortexu. Pokud látka v DMSO rozpustí nebo vytvoří homogenní suspenzi, do sterilní zkumavky č. 1 napipetujeme 1,98ml růstového média a 20 μ l rozpuštěné testované látky, pokud se látka v DMSO nerozpustila, přidáme další ekvivalentní množství rozpouštědla, nebo mírně zahřejeme. Každým přidáním rozpouštědla se posouvá koncentrace o jedno ředění dozadu (z 500 μ mol/l na 250 μ mol/l). Zkontrolujeme, zda se látka v růstovém médiu nevysrážela, pokud ne, přemístíme tento roztok 1. testované koncentrace do 12-ti jamkového rezervoáru, pokud ano, přidáme další ekvivalent růstového média, čímž se sníží 1. testovaná koncentrace z 500 μ mol/l na 250 μ mol/l. Následně si připravíme sterilní zkumavky 2-11 a připravíme si dvojkovou ředící řadu testované látky v DMSO: do každé zkumavky napipetujeme 0,5ml DMSO do zkumavky č. 2 napipetujeme 0,5ml testované látky rozpuštěné v DMSO, promícháme a přeneseme 0,5ml ze zkumavky 2 do zkumavky 3, pokračujeme až po zkumavku č. 11. Do jamek 2-12 12ti jamkového rezervoáru napipetujeme 1,98 ml růstového média a přidáme 20 μ l naředěné testované látky (do jamky č.2 - ze zkumavky č.2, do jamky č.3 - ze zkumavky č.3, atd.).

4.2.4 PIPETOVÁNÍ DO DESTIČKY

Pomocí 12ti kanálové pipety napipetujeme 200 μ l příslušného zásobního roztoku do řádků A, B, C, D, E, G a H jedné mikrotitrační destičky a do tolika řádků druhé destičky, kolik máme testovaných látek. Do každé jamky řádku A první destičky napipetujeme 10 μ l připravené suspenze *Candida albicans* CA ATCC 44859, tak pokračujeme se všemi připravenými suspenzemi testovaných kmenů hub po jednotlivých řádcích. Do každé jamky druhé destičky napipetujeme 10 μ l připravené suspenze *Trichophyton mentagrophytes* TM 445. Přiklopíme víčkem a inkubujeme v termostatu na 35°C – první destičku 48 hod (odečet MIC za 24 hod a 48 hod), druhou destičku s dermatofytem 120hod (odečet MIC za 72 hod a 120 hod).



Obr. 36 Pipetování pomocí osmi kanálové pipety do mikrodestičky

<http://www.splm.cz/Fotobanka?id=140>

4.2.5 VYHODNOCENÍ (ODEČET IC_{80})

Po uplynutí inkubační doby hodnotíme nárůst v jamkách. Minimální koncentrace látky inhibující růst houby, odpovídá jamce, ve které dojde k 80% potlačení růstu kvasinky resp. plísně.

4.3 SEZNAM TESTOVANÝCH LÁTEK

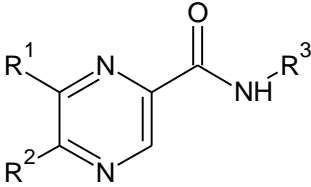
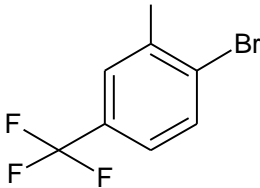
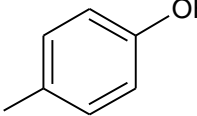
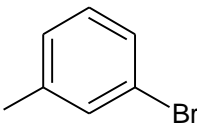
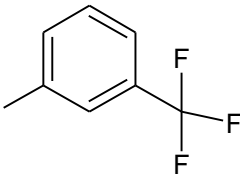
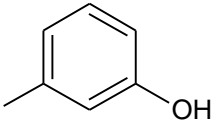
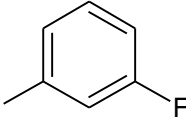
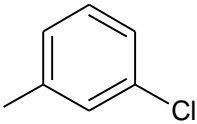
Do pokusu jsme zahrnuli látky syntetizované na Katedře anorganické a organické chemie (Ing. Skála P., Doc. Macháček M.), Katedře farmaceutické chemie a kontroly léčiv (Doc. Doležal M.) Farmaceutické fakulty v Hradci Králové. Přehled testovaných skupin je uveden v Tab. 1, jejich chemické vzorce jsou v tabulkách č. 2-6.

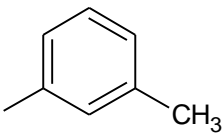
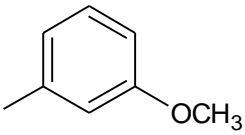
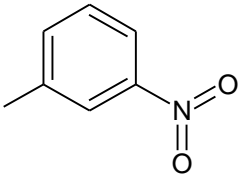
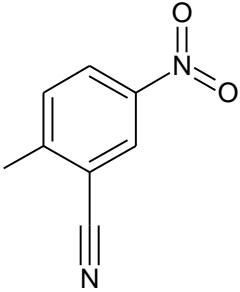
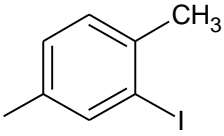
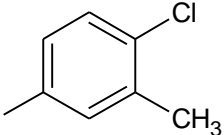
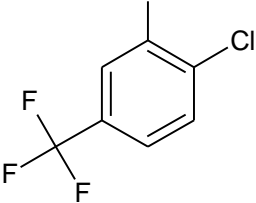
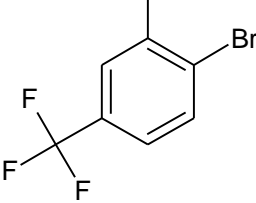
Tab. 1 Přehled testovaných skupin látek

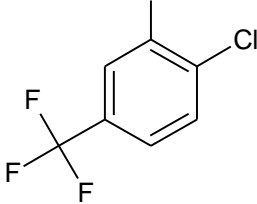
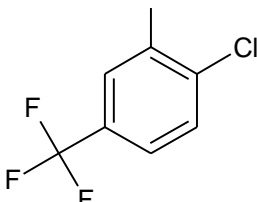
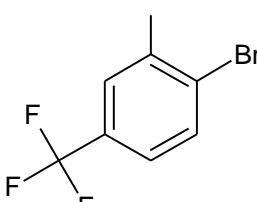
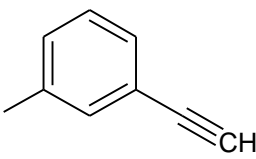
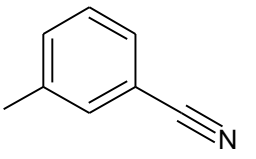
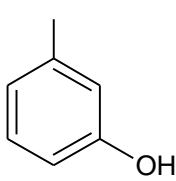
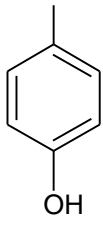
Deriváty pyrazin-2-karboxamidu
Deriváty 3-hydrazinopyrazin-2-karboxamidu
Deriváty benzoxazinu
Deriváty 2-isonikotinoylhydrazinkarboxylátu

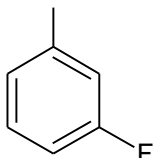
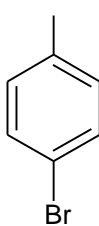
4.3.1 DERIVÁTY PYRAZIN-2-KARBOXAMIDU

Tab. 2 Deriváty 3-hydrazinopyrazin-2-karboxamidu

					
KÓD LÁTKY	R ¹	R ²	R ³	M. H.	NÁZEV
MD 546/II	H	H		344,97	N-[2-brom-5-(trifluormethyl)fenyl]pyrazin-2-karboxamid
MD 475/II	H	CH ₃ -		229,24	N-(4-hydroxyfenyl)-5-methylpyrazin-2-karboxamid
MD 476/II	H	CH ₃ -		292,14	N-(3-bromfenyl)-5-methylpyrazin-2-karboxamid
MD 477/II	H	CH ₃ -		281,24	5-methyl-N-[3-(trifluormethyl)fenyl]pyrazin-2-karboxamid
MD 494/II	H	CH ₃ -		229,24	N-(3-hydroxyfenyl)-5-methylpyrazin-2-karboxamid
MD 495/II	H	CH ₃ -		231,23	N-(3-fluorfenyl)-5-methylpyrazin-2-karboxamid
MD 528/II	H	CH ₃ -		247,69	N-(3-chlorfenyl)-5-methylpyrazin-2-karboxamid

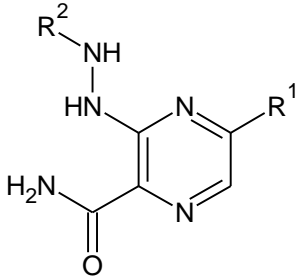
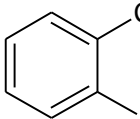
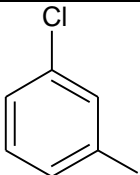
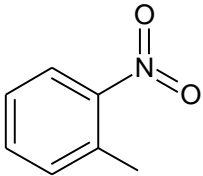
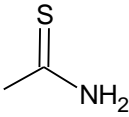
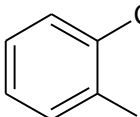
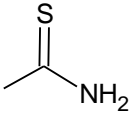
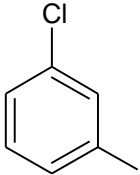
MD 529/II	H	CH ₃ -		227,27	<i>N</i> -(3-tolyl)-5-methylpyrazin-2-karboxamid
MD 530/II	H	CH ₃ -		243,27	<i>N</i> -(3-methoxyfenyl)-5-methylpyrazin-2-karboxamid
MD 531/II	H	CH ₃ -		258,24	<i>N</i> -(3-nitrofenyl)-5-methylpyrazin-2-karboxamid
MD 532/II	H	CH ₃ -		283,25	<i>N</i> -(2-kyan-4-nitrofenyl)-5-methylpyrazin-2-karboxamid
MD 533/II	H	CH ₃ -		353,16	<i>N</i> -(3-jod-4-methylfenyl)-5-methylpyrazin-2-karboxamid
MD 534/II	H	CH ₃ -		261,71	<i>N</i> -(4-chlor-3-methylfenyl)-5-methylpyrazin-2-karboxamid
MD 549/II	Cl-	H		334,98	<i>N</i> -[2-chlor-5-(trifluormethyl)fenyl]-6-chlor pyrazin-2-karboxamid
MD 550/II	Cl-	H		378,93	<i>N</i> -[2-brom-5-(trifluormethyl)fenyl]-6-chlorpyrazin-2-karboxamid

MD 551/II	H	-C(CH ₃) ₃		357,09	5- <i>tert</i> -butyl- <i>N</i> -[2-chlor-5-(trifluormethyl)fenyl]pyrazin-2-karboxamid
MD 552/II	Cl-	-C(CH ₃) ₃		391,05	5- <i>tert</i> -butyl-6-chlor- <i>N</i> -[2-chlor-5-(trifluormethyl)fenyl]pyrazin-2-karboxamid
MD 553/II	Cl-	-C(CH ₃) ₃		435,00	5- <i>tert</i> -butyl-6-chlor- <i>N</i> -[2-brom-5-(trifluormethyl)fenyl]pyrazin-2-karboxamid
MD 524/II	Cl-	-C(CH ₃) ₃		313,79	5- <i>tert</i> -butyl-6-chlor- <i>N</i> -(3-ethynylfenyl)pyrazin-2-karboxamid
MD 525/II	Cl-	-C(CH ₃) ₃		314,78	5- <i>tert</i> -butyl-6-chlor- <i>N</i> -(3-kyanfenyl)pyrazin-2-karboxamid
MD 503/II	Cl-	-butyl -C ₄ H ₉		305,77	5-butyl-6-chlor- <i>N</i> -(3-hydroxyfenyl)pyrazin-2-karboxamid
MD 504/II	Cl-	-butyl -C ₄ H ₉		305,77	5-butyl-6-chlor- <i>N</i> -(4-hydroxyfenyl)pyrazin-2-karboxamid

MD 505/II	Cl-	-butyl -C ₄ H ₉		307,76	5-butyl-6-chlor- <i>N</i> -(3-fluorfenyl)pyrazin-2-karboxamid
MD 507/II	Cl-	-butyl -C ₄ H ₉		368,66	5-butyl-6-chlor- <i>N</i> -(4-bromfenyl)pyrazin-2-karboxamid

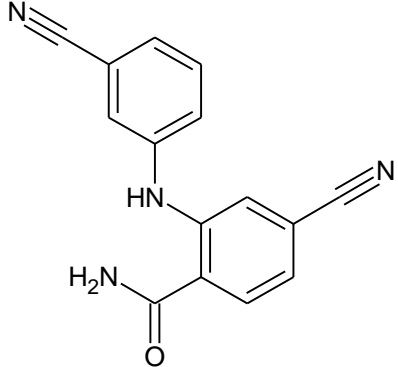
4.3.2 DERIVÁTY 3-HYDRAZINOPYRAZIN-2-KARBOXAMIDU

Tab. 3 Deriváty 3-hydrazinopyrazin-2-karboxamidu

				
KÓD LÁTKY	R ¹	R ²	M. H.	NÁZEV
DK-4	—C≡N		288,69	5-kyan-3-[2-(2-chlorofenyl)hydrazino]pyrazin-2-karboxamid
DK-5	—C≡N		288,69	5-kyan-3-[2-(3-chlorofenyl)hydrazino]pyrazin-2-karboxamid
DK-7	—C≡N		299,24	5-kyan-3-[2-(2-nitrofenyl)hydrazino]pyrazin-2-karboxamid
DK-18			322,77	5-karbamothionyl-3-[2-(2-chlorofenyl)hydrazino]pyrazin-2-karboxamid
DK-19			322,77	5-karbamothionyl-3-[2-(3-chlorofenyl)hydrazino]pyrazin-2-karboxamid

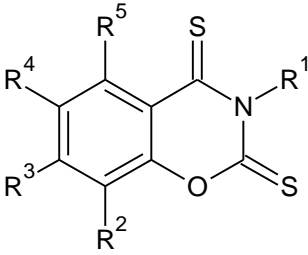
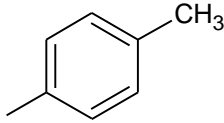
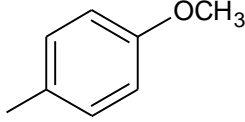
4.3.3 5-KYAN-3-[(3-ETHYNYLFENYL)AMINO]PYRAZIN-2-KARBOXAMID

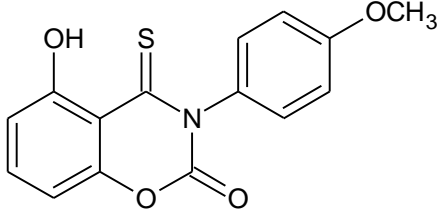
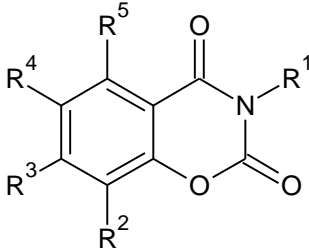
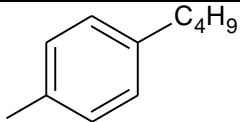
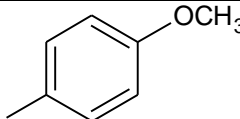
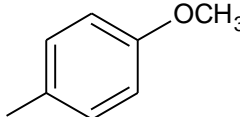
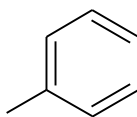
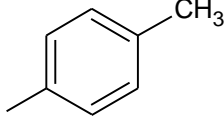
Tab. 4 5-kyan-3-[(3-ethynylfenyl)amino]pyrazin-2-karboxamid

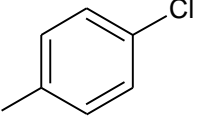
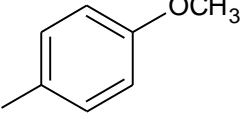
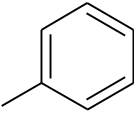
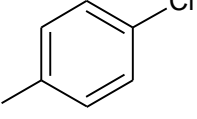
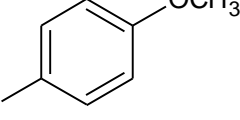
KÓD LÁTKY	VZOREC	M. H.	NÁZEV
MD-458		263,26	5-kyan-3- [(3ethynylfenyl)amino]pyrazin- 2-karboxamid

4.3.4 DERIVÁTY BENZOXAZINU

Tab. 5 Deriváty benzoxazinu

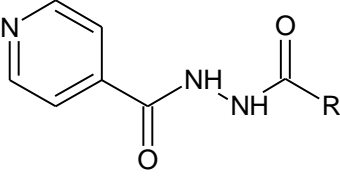
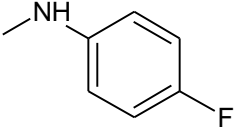
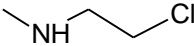
							
KÓD LÁTKY	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	M.H.	NÁZEV
RAM 364		H	H	H	-OH	301,39	5-hydroxy-3(4-methylfenyl)-2 <i>H</i> -1,3-benzoxazin-2,4(3 <i>H</i>)-dithion
RAM 343		H	H	H	-OH	317,39	5-hydroxy-3(4-methoxyfenyl)-2 <i>H</i> -1,3-benzoxazin-2,4(3 <i>H</i>)-dithion

RAM 344						301,32	5-hydroxy-3(4-methoxyfenyl)-4-thioxo-3,4-dihydro-2 <i>H</i> -1,3-benzoxazin-2-on
							
KÓD LÁTK Y	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	M.H.	NÁZEV
RAM 363		H	H	H	-OH	311,34	3-(4-butylfenyl)-5-hydroxy-2 <i>H</i> -1,3-benzoxazin-2,4(3 <i>H</i>)-dion
RAM 338		H	H	H	-OH	285,26	5-hydroxy-3(4-methoxyfenyl)-2 <i>H</i> -1,3-benzoxazin-2,4(3 <i>H</i>)-dion
RAM 352		H	H	-OH	H	285,26	6-hydroxy-3(4-methoxyfenyl)-2 <i>H</i> -1,3-benzoxazin-2,4(3 <i>H</i>)-dion
RAM 340		H	-OH	H	H	255,23	7-hydroxy-3-fenyl-2 <i>H</i> -1,3-benzoxazin-2,4(3 <i>H</i>)-dion
RAM 337		H	-OH	H	H	269,26	7-hydroxy-3(4-methylfenyl)-2 <i>H</i> -1,3-benzoxazin-2,4(3 <i>H</i>)-dion

RAM 353		H	-OH	H	H	289,68	3-(4-chlorfenyl)-7-hydroxy-2 <i>H</i> -1,3-benzoxazin-2,4(3 <i>H</i>)-dion
RAM 349		H	-OH	H	H	285,26	7-hydroxy-3(4-methoxyfenyl)-2 <i>H</i> -1,3-benzoxazin-2,4(3 <i>H</i>)-dion
RAM 347		-OH	H	H	H	255,23	8-hydroxy-3-fenyl-2 <i>H</i> -1,3-benzoxazin-2,4(3 <i>H</i>)-dion
RAM 351		-OH	H	H	H	289,68	3-(4-chlorfenyl)-8-hydroxy-2 <i>H</i> -1,3-benzoxazin-2,4(3 <i>H</i>)-dion
RAM 348		-OH	H	H	H	285,26	8-hydroxy-3(4-methoxyfenyl)-2 <i>H</i> -1,3-benzoxazin-2,4(3 <i>H</i>)-dion

4.3.5 Deriváty 2-isonikotinoylhydrazinkarboxylátu

Tab. 6 Deriváty 2-isonikotinoylhydrazinkarboxylátu

			
KÓD LÁTKY	R	M. H.	NÁZEV
IJ 127	-OCH ₃	195,06	methyl-2-isonikotinoylhydrazinkarboxylát
IJ-167		274,09	N-(4-fluorofenyl)-2-isonikotinoylhydrazinkarboxamid
IJ141		242,06	N-(2-chloroethyl)-2-isonikotinoylhydrazinkarboxamid

4.4 VÝSLEDKY

Látky jsme testovali v koncentracích: 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,625; 7,813; 3,906; 1,953; 0,977; 0,488 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ **Tučně** jsou znázorněny hodnoty MIC v rámci testovaného rozmezí.

4.4.1 DERIVÁTY PYRAZIN-2-KARBOXAMIDU A 5-KYAN-3-[(3-ETHYNYLFENYL)AMINO]PYRAZIN-2-KARBOXAMID

Testované látky, až na jednu výjimku MD 528/II (účinnost po 48 h. – CA, TB, TM), nebyly příliš účinné. Látky MD 476/II, MD 494/II, MD 495/II, MD 528/II, MD 530/II, MD 531/II, MD 533/II, MD 524/II, vykazovaly účinnost na CA po 24 h. kultivaci, po 48 h. zůstal účinný jen zlomek látek (MD 494/II, MD 495/II, MD 528/II, MD 530/II). Látka MD 477/II byla účinná při nejvyšší koncentraci po 120 h. kultivace na TM. Zbytek látek (MD 546/II, MD 475/II, MD 529/II, MD 534/II, MD 549/II, MD 550/II, MD 551/II, MD 552/II, MD 553/II, MD 503/II, MD 504/II, MD 505/II, MD 507/II, MD 525/II) nebyl účinný při žádné měřené koncentraci na žádný z testovaných kmenů.

Látka MD 458/II, strukturou vybočující z řady ostatních látek byla účinná na všechny testované kmeny kvasinek a vláknitých hub.

Tab. 7 Deriváty pyrazin-2-karboxamidu

KMEN		TESTOVANÁ LÁTKA (kód) – MIC/IC ₈₀ (μmol.l ⁻¹)									
		MD 546/II	MD 475/II	MD 476/II	MD 477/II	MD 494/II	MD 495/II	MD 528/II	MD 529/II	MD 530/II	MD 531/II
CA	24 h	>125	>500	125	>500	125	125	31,25	>250	125	250
	48 h	>125	>500	>250	>500	250	500	62,5	>250	250	>500
CT	24 h	>125	>500	250	>500	>500	>500	250	>250	>500	>500
	48 h	>125	>500	>250	>500	>500	>500	>500	>250	>500	>500
CK	24 h	>125	>500	>250	>500	250	>500	250	>250	>500	>500
	48 h	>125	>500	>250	>500	500	>500	>500	>250	>500	>500
CG	24 h	>125	>500	250	250	>500	>500	500	>250	>500	>500
	48 h	>125	>500	>250	>500	>500	>500	>500	>250	>500	>500
TB	24 h	>125	>500	250	>500	>500	>500	62,5	>250	>500	>500
	48 h	>125	>500	>250	>500	>500	>500	250	>250	>500	>500
AF	24 h	>125	>500	250	>500	>500	>500	500	>250	>500	>500
	48 h	>125	>500	>250	>500	>500	>500	>500	>250	>500	>500
AC	24 h	>125	>500	>250	>500	>500	>500	500	>250	>500	>500
	48 h	>125	>500	>250	>500	>500	>500	>500	>250	>500	>500
TM	72 h	>125	>500	125	125	>500	>500	250	>250	500	>500
	120 h	>125	>500	>250	500	>500	>500	500	>250	500	>500

Tab. 8 Deriváty pyrazin-2-karboxamidu

KMEN		TESTOVANÁ LÁTKA (kód) – MIC/IC ₈₀ (μmol.l ⁻¹)									
		MD 532/II	MD 533/II	MD 534/II	MD 549/II	MD 550/II	MD 551/II	MD 552/II	MD 553/II	MD 524/II	MD 525/II
CA	24 h	500	125	>250	>500	>500	>500	>500	>500	125	>250
	48 h	>500	>125	>250	>500	>500	>500	>500	>500	>125	>250
CT	24 h	>500	>125	>250	>500	>500	>500	>500	>500	>125	>250
	48 h	>500	>125	>250	>500	>500	>500	>500	>500	>125	>250
CK	24 h	>500	>125	>250	>500	>500	>500	>500	>500	62,5	>250
	48 h	>500	>125	>250	>500	>500	>500	>500	>500	>125	>250
CG	24 h	>500	31,25	>250	>500	>500	>500	>500	>500	62,5	>250
	48 h	>500	125	>250	>500	>500	>500	>500	>500	>125	>250
TB	24 h	>500	>125	>250	>500	>500	>500	>500	>500	>125	>250
	48 h	>500	>125	>250	>500	>500	>500	>500	>500	>125	>250
AF	24 h	>500	>125	>250	>500	>500	>500	>500	>500	125	>250
	48 h	>500	>125	>250	>500	>500	>500	>500	>500	>125	>250
AC	24 h	>500	>125	>250	>500	>500	>500	>500	>500	>125	>250
	48 h	>500	>125	>250	>500	>500	>500	>500	>500	>125	>250
TM	72 h	250	>125	>250	>500	>500	>500	>500	>500	>125	>250
	120 h	500	>125	>250	>500	>500	>500	>500	>500	>125	>250

Tab. 9 Deriváty pyrazin-2-karboxamidu a 5-kyan-3-[(3-ethynylfenyl)amino]pyrazin-2-karboxamid

KMEN		TESTOVANÁ LÁTKA (kód) – MIC/IC ₈₀ (μmol.l ⁻¹)									
		MD 503/II	MD 504/II	MD 505/II	MD 507/II	MD 458/II					
CA	24 h	>500	>500	>500	>250	250					
	48 h	>500	>500	>500	>250	250					
CT	24 h	>500	>500	>500	>250	250					
	48 h	>500	>500	>500	>250	250					
CK	24 h	>500	>500	>500	>250	250					
	48 h	>500	>500	>500	>250	250					
CG	24 h	>500	>500	>500	>250	62,5					
	48 h	>500	>500	>500	>250	125					
TB	24 h	>500	>500	>500	>250	125					
	48 h	>500	>500	>500	>250	125					
AF	24 h	>500	>500	>500	>250	250					
	48 h	>500	>500	>500	>250	250					
AC	24 h	>500	>500	>500	>250	250					
	48 h	>500	>500	>500	>250	250					
TM	72 h	>500	>500	>500	>250	31,25					
	120 h	>500	>500	>500	>250	125					

4.4.2 DERIVÁTY 3-HYDRAZINOPYRAZIN-2-KARBOXAMIDU

Testované deriváty byly různě účinné na různé kmeny kvasinek a hub, všechny kromě DK-7-3 vykazovaly účinnost na TM. Látky DK-4-2, DK-5-2, DK-7-3, jsou přečištěné látky DK-4, DK-5, DK-7, u kterých se očekávala teoreticky vyšší účinnost, než u látek s menší čistotou. Výsledek byl paradoxně opačný. Nejúspěšnější z látek byl DK-19, který vykazoval účinnost na všechny kmeny kvasinek a vláknitých hub.

Tab. 10 Deriváty 3-hydrazinopyrazin-2-karboxamidu

KMEN		TESTOVANÁ LÁTKA (kód) – MIC/IC ₈₀ (μmol.l ⁻¹)									
		DK-4	DK-4-2	DK-5	DK-5-2	DK-7	DK-7-3	DK-18	DK-19		
CA	24 h	62,5	>500	31,25	62,5	>250	>125	62,5	62,5		
	48 h	>500	>500	125	125	>250	>125	125	125		
CT	24 h	>500	>500	62,5	500	>250	>125	62,5	125		
	48 h	>500	>500	250	>500	>250	>125	125	250		
CK	24 h	62,5	>500	7,81	31,25	>250	>125	31,25	15,62		
	48 h	>500	>500	15,62	125	>250	>125	62,5	62,5		
CG	24 h	>500	>500	>250	>500	>250	>125	>125	250		
	48 h	>500	>500	>250	>500	>250	>125	>125	500		
TB	24 h	>500	>500	62,5	125	>250	>125	62,5	31,25		
	48 h	>500	>500	250	>250	>250	>125	125	125		
AF	24 h	>500	>500	250	250	>250	>125	>125	125		
	48 h	>500	>500	>250	>250	>250	>125	>125	500		
AC	24 h	500	>500	62,5	250	>250	>125	>125	62,5		
	48 h	>500	>500	250	250	>250	>125	>125	62,5		
TM	72 h	31,25	125	31,25	31,25	31,25	>125	15,62	62,5		
	120 h	31,25	125	31,25	62,5	125	>125	31,25	62,5		

4.4.3 DERIVÁTY BENZOXAZINU A DERIVÁTY 2-ISONIKOTINOYLHYDRAZINKARBOXYLÁTU

Některé látky z derivátů benzoxazinu vykazovaly po 48 h. kultivaci účinnost na CA nebo TB, AC, či TM (RAM 343, RAM 340, RAM 337, RAM 353), vše bylo ale při vysokých koncentracích, které nejsou terapeuticky využitelné. Jako účinnou je možno označit látku RAM 352, která vykazovala účinnost na CA, CT, CK, CG, TB, TM. Nejúspěšnější z derivátů benzoxazinu byly látky RAM 347, RAM 351, RAM 348, které byly účinné na všechny testované kmeny kvasinek a vláknitých hub, a to i v nižších koncentracích.

Deriváty 2-isonikotinoylhydrazinkarboxylatu byly neúčinné při všech měřených koncentracích na všechny testované kmeny hub a kvasinek.

Tab. 11 Deriváty benzoxazinu

KMEN		TESTOVANÁ LÁTKA (kód) – MIC/IC ₈₀ (μmol.l ⁻¹)									
		RAM 364	RAM 343	RAM 344	RAM 363	RAM 338	RAM 352	RAM 340	RAM 337	RAM 353	RAM 349
CA	24 h	>250	250	>250	>125	>250	250	>500	500	500	>125
	48 h	>250	250	>250	>125	>250	250	>500	>500	500	>125
CT	24 h	>250	>250	>250	>125	>250	250	>500	>500	>500	>125
	48 h	>250	>250	>250	>125	>250	250	>500	>500	>500	>125
CK	24 h	>250	>250	>250	>125	>250	250	>500	>500	>500	>125
	48 h	>250	>250	>250	>125	>250	250	>500	>500	>500	>125
CG	24 h	>250	>250	>250	>125	>250	250	>500	>500	>500	>125
	48 h	>250	>250	>250	>125	>250	250	>500	>500	>500	>125
TB	24 h	>250	>250	>250	>125	>250	250	500	>500	>500	>125
	48 h	>250	>250	>250	>125	>250	250	500	>500	>500	>125
AF	24 h	>250	>250	>250	>125	>250	>500	>500	>500	>500	>125
	48 h	>250	>250	>250	>125	>250	>500	>500	>500	>500	>125
AC	24 h	>250	>250	>250	>125	>250	>500	>500	>500	500	>125
	48 h	>250	>250	>250	>125	>250	>500	>500	>500	500	>125
TM	72 h	>250	>250	>250	>125	>250	250	>500	250	125	>125
	120 h	>250	>250	>250	>125	>250	500	>500	500	250	>125

Tab. 12 Deriváty benzoxazinu a Deriváty 2-isonikotinoylhydrazinkarboxylátu

KMEN		TESTOVANÁ LÁTKA (kód) – MIC/IC ₈₀ (μmol.l ⁻¹)									
		RAM 347	RAM 351	RAM 348	IJ 127	IJ 167	IJ 141				
CA	24 h	125	15,62	125	>500	>500	>500				
	48 h	250	31,25	125	>500	>500	>500				
CT	24 h	250	31,25	250	>500	>500	>500				
	48 h	250	62,5	250	>500	>500	>500				
CK	24 h	250	31,25	125	>500	>500	>500				
	48 h	250	31,25	125	>500	>500	>500				
CG	24 h	62,5	3,9	31,25	>500	>500	>500				
	48 h	62,5	3,9	31,25	>500	>500	>500				
TB	24 h	250	31,25	250	>500	>500	>500				
	48 h	250	62,5	250	>500	>500	>500				
AF	24 h	250	62,5	250	>500	>500	>500				
	48 h	500	125	500	>500	>500	>500				
AC	24 h	250	15,62	250	>500	>500	>500				
	48 h	250	31,25	250	>500	>500	>500				
TM	72 h	125	62,5	250	>500	>500	>500				
	120 h	125	62,5	250	>500	>500	>500				

5. DISKUZE

V posledních letech se stává jedním z dominantních problémů vzrůstající incidence mykotických infekcí a vzrůstající rezistence mikroorganismů k účinkům antimykotik. Z tohoto důvodu je nutno nalézat nová, účinnější a bezpečnější antimykotika, která by pomohla tento problém řešit. Objevováním nových potencionálně účinných antifungálních látek se zabývají na naší fakultě Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv a Katedra anorganické a organické chemie. Aby bylo možné látky posoudit z hlediska účinku, je nutno látky otestovat, což je předmětem této diplomové práce.

Existuje mnoho způsobů jak testovat antimykotickou účinnost, ale žádná z metod není univerzální, tj. neumožňuje testovat všechny skupiny antifungálních látek a houbových kmenů. Výsledné hodnocení účinnosti ovlivňuje celá řada faktorů. Již na začátku je to výběr metody, následně složení, pH a stupeň aerace média, teplota a délka inkubace, rozpouštědlo, pufr. I vlastnosti testovaného kmene hub a testovaného antimykotika hrají svoji roli, jak jsme se o tom i my přesvědčili během testování. U antimykotika je důležitá rozpustnost, stabilita, mechanismus účinku, protonizace a eagle efekt (Buchta, 1993). V posledních letech byl udělán velký pokrok ve standardizaci metod vhodných k testování antimykotik *in vitro* a je na laboratoři, aby zvolila metodu, která je dostatečně standardizovaná, s vnitřním systémem kontroly a poskytuje dostatečně reprodukovatelné výsledky (Mallátová, 2007).

Celosvětově respektovaná Clinical Laboratory Standard Institute, Pensylvania, USA (CLSI dříve NCCLS) schválila již v roce 1997 dokument M27-A, který standardizuje způsob provádění testů citlivosti kvasinek k ATM (v platnosti je verze M27-A2 z roku 2002) a později dokument M38-A pro vláknité mikromycety. Jedná se o metodu kvantitativní, poskytující možnost stanovit minimální inhibiční koncentraci (MIC) a umožňující dle hodnoty MIC zařadit testovaný izolát do kategorie citlivý (S), citlivý v závislosti na dávce (SDD–Susceptible-Dose Dependent), rezistentní (R). Metodika pro testování citlivosti kvasinek k flukonazolu diskovou difúzní metodou, publikovaná v roce 1996 Barrym a Braunem, byla následně ověřena v celosvětové surveillance studii ARTEMIS a v roce 2004 uznána CLSI jako standard M44-A .

Standard M27-A2 určuje postup při testování citlivosti kvasinek *Candida* spp. a *Cryptococcus neoformans*. Jedná se o metodu mikrodiluční s použitím media RPMI –

1640 s glutaminem, bez bikarbonátů, obohacené 0,2 % glukózy, hustota inokula 0,5 McFarland, inkubace při 35°C 24 hodin pro *Candida* spp. a 48-72 hodin pro *Cryptococcus neoformans*. Hodnotí se stupeň zákalu dle daných kritérií. Interpretační kritéria jsou uvedena v tabulce č. 13.

Tab. 13 Interpretační kritéria standardu CLSI M27 (MIC v g/ml)

	Citlivý (S)	Citlivost závislá na dávce (SDD)	Intermediární	Rezistentní (R)
FLUKONAZOL	≤ 8	16-32		≥ 64
ITRAKONAZOL	$\leq 0,125$	0,25-0,50		≥ 1
VORIKONAZOL	≤ 1	2		≥ 4
FLUCYTOSIN	≤ 4		8-16	≥ 32

Standard CLSI pro vláknité mikromycety (Dokument CLSI M38-A) popisuje metodiku pro stanovení citlivosti vláknitých mikromycet včetně *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Pseudoallescheria (Scedosporium)* spp., i zygomycet. Je použito obdobné medium jako pro testování kvasinek, avšak je kladen důraz na přípravu inokula s kontrolou density pomocí spektrofotometru rozdílně pro jednotlivé druhy. I doba inkubace se liší v závislosti na druhu (např. *Rhizopus* 24 hodin, *Aspergillus* a *Fusarium* 48 hodin) (Mallátová, 2007).

Pro testování antimykotik v této diplomové práci byla použita mikrodiluční bujónová metoda. Hodnocení aktivity se řídí výše zmíněnými standardy. Bylo otestováno 49 látek rozdělených do čtyř skupin, podle jejich chemické struktury. Jedná se o lipofilní látky.

Deriváty pyrazin-2-karboxamidu nevykazovaly výraznou účinnost, u osmi sloučenin (MD546/II, MD476/II, MD529/II, MD533/II, MD534/II, MD524/II, MD525/II, MD 507/II) byly problémy s rozpustností, jak v DMSO, tak v RPMI, tudíž ani nebylo možné zaznamenat potencionální antifungální aktivitu ve vyšších koncentracích. V substituci pyrazinu bylo znatelných několik modifikací.

1. skupina látek je substituována malým alkylem ($-\text{CH}_3$) v poloze 5 pyrazinu a substituována na dusíku (N) amidové skupiny fenylem s elektronegativní skupinou v poloze *m* (trifluormethan ($-\text{CF}_3$), fluór ($-\text{F}$), chlór ($-\text{Cl}$)), nebo hydroxy skupinou ($-\text{OH}$), tento typ substituce vykazoval při vyšších koncentracích účinnost na některé kvasinky a vláknité houby. Kromě MD477/II vykazovaly všechny látky této skupiny účinnost na CA, nejúspěšnější z této skupiny byla látka MD528/II, která byla účinná po 24(72) h. inkubaci na všechny testované kmeny hub, po 48(120) h. inkubaci, ale jen na CA, TB a TM. Změna polohy elektronegativní skupiny z polohy *m* do *p* (MD475/II) přinesla ztrátu účinku, taktéž látka bez methylace v poloze 5 (MD546/II) byla bez účinku.

2. skupina látek je substituována velkým alkylem (tercetyl, butyl) v poloze 5 pyrazinu, $-\text{Cl}$ v poloze 6 pyrazinu a substituována na N amidové skupiny fenylem, který je:

- disubstituován v polohách 2,5 elektronegativními skupinami ($-\text{Cl}$, $-\text{CF}_3$, $-\text{Br}$)
- v poloze *m* nebo *p* substituován kyanidovou, ethynylovou skupinou, $-\text{OH}$, $-\text{F}$, $-\text{Br}$

Tyto modifikace nepřinesly žádné pozitivní účinky, všechny látky byly neúčinné, kromě MD524/II, která se bohužel nerozpouštěla dostatečně jak v DMSO, tak v RPMI a byla tudíž testována od koncentrace $125\mu\text{mol.l}^{-1}$. I látky bez objemného substituentu v poloze 5 pyrazinu nevykazovaly žádnou účinnost. Z toho jednoznačně plyne, že N-substituce amidové skupiny fenylem s více elektronegativními skupinami má negativní účinek na antifungální aktivitu u všech testovaných látek.

Z derivátů pyrazin-2-karboxamidu svou strukturou i účinkem vybočuje látka 5-kyan-3-[(3-ethynylfenyl)amino]pyrazin-2-karboxamid, tato látka byla účinná na všechny druhy kvasinek a hub jak po 24 (72) h tak po 48 (120) h, bohužel se srážela v RPMI, tudíž byla použita pro testování jen druhá nejvyšší koncentrace.

Další skupinou testovaných látek byly deriváty 3-hydrazinopyrazin-2-karboxamidu. Všechny deriváty kromě (DK-7-3) vykazovaly účinnost na TM i po 120 h inkubaci. Zajímavostí této skupiny je, že látky (DK-4, DK-5, DK-7), byly přečištěny a následně otestovány znovu. Očekávalo se, že přečištěné látky (DK-4-2, DK-5-2, DK-7-3) budou mít vyšší účinnost, než původní látky. Bohužel se tato hypotéza nepotvrdila a přečištěné látky neměly žádnou účinnost (DK-7-3) nebo mnohem nižší

účinnost (DK-4-2, DK-5-2). Deriváty 3-hydrazinopyrazin-2-karboxamidu jsou substituovány v polohách 5-pyrazinu kyanidovou skupinou nebo karbathionylovou skupinou, substituentem na N-hydrazinu je fenyl substituovaný v polohách *o* nebo *m*, chlorem nebo nitro skupinou. Substituce nitro skupinou (DK-7, DK-7-3) se ukázala nejméně vhodnou, jelikož na všechny druhy testovaných hub kromě TM, byly látky neúčinné. Ze substitucí fenylu chlorem se ukázala jako výhodnější substituce v poloze *m*. Nejúspěšnější látkou skupiny je látka DK-19, která byla účinná na všechny typy testovaných kvasinek a hub. I tyto látky měly problémy s rozpustností, ale jen v RPMI, v DMSO se rozpouštěly dobře.

Třetí testovanou skupinou látek byly deriváty benzoxazinu. Většina látek má v poloze 2 a 4 oxo skupinu (RAM 363, RAM 338, RAM 352, RAM 340, RAM 337, RAM 353, RAM 349, RAM 347, RAM 351, RAM 348), náhrada kyslíku sírou (RAM 364, RAM 343, RAM 344) se ukázala pro antifungální účinek nevhodná. Jako rozhodující se jeví substituce hydroxy skupinou a hlavně její poloha na benzoxazinovém jádře a to v polohách 5, 6, 7, 8. Nejvhodnější z hlediska účinku byla substituce hydroxy skupinou v poloze 8 (RAM 347, RAM 351, RAM 348), tyto látky byly účinné na všechny druhy kvasinek a hub a to i ve velmi nízkých koncentracích. Substituce na N v poloze 3 benzoxazinu fenylem je také podstatná, ale ne zcela důvodem účinku. Substituce fenylu v poloze *p* ovlivnila účinek pozitivním způsobem v případě substituce chlorem, substituce methoxy ($-\text{OCH}_3$) skupinou měla téměř stejný efekt jako nesubstituovaný fenyl, a to jen u derivátů s hydroxy skupinou v poloze 8. Z toho plyne, že podstatou účinku derivátu benzoxazinu je substituce oxo skupinou v polohách 2, 4, fenylem na N v poloze 3 benzoxazinu a hlavně hydroxy skupinou v poloze 8.

Poslední testovanou skupinou látek byly deriváty 2-isonikotinoylhydrazinkarboxylátu, ty se dobře rozpouštěly v DMSO i RPMI, ale byly naprosto neúčinné.

Testování potencionální antifungální aktivity nově syntetizovaných látek je jen prvním krokem v získání skutečně účinného a bezpečného léčiva. K dosažení cíle je nutno otestovat tisíce a tisíce látek, které následně musí projít dalšími náročnými testy, proto nemůžeme říci, že některá s testovaných látek se stane léčivem dokud nebude provedeno více testů.

6. ZÁVĚR

1. Mikrodiluční bujónovou metodou bylo testováno 49 látek rozdělených do čtyř skupin, podle jejich struktury. Látky byly testovány na osmi kmenech kvasinek a vláknitých hub.
2. Skupina derivátů pyrazin-2-karboxamidu, substituovaná malým alkylem ($-\text{CH}_3$) v poloze 5 pyrazinu a N amidové skupiny substitovaným fenylem s elektronegativní skupinou v poloze *m* ($-\text{CF}_3$, $-\text{F}$, $-\text{Cl}$, $-\text{OH}$), vykazovala při vyšších koncentracích účinnost na některé kvasinky a vláknité houby, krom jedné MD477/II vykazovaly všechny látky této skupiny účinnost na CA. Za dalších modifikací struktury plyne, že N-substituce amidové skupiny fenylem s více elektronegativními skupinami má negativní účinek na antifungální aktivitu u všech testovaných látek.
3. Přečištění látek ve skupině 3-hydrazinopyrazin-2-karboxamidu nepřineslo zvýšení účinku, naopak se antifungální účinnost látek snížila. Všechny látky (kromě jedné z přečištěných látek) byly účinné na *Trichophyton mentagrophytes*.
4. Podstatou účinku derivátu benzoxazinu je substituce oxo skupinou v polohách 2, 4, fenylem na N v poloze 3 benzoxazinu a hlavně hydroxy skupinou v poloze 8. Deriváty benzoxazinu s hydroxy skupinou v poloze 8 byly účinné na všechny druhy testovaných kmenů.
5. Deriváty 2-isonikotinoylhydrazinkarboxylátu byly neúčinné.
6. Nejcitlivější k testovaným látkám byly kmeny *Trichophyton mentagrophytes* a *Candida albicans*.
7. Nejúčinnějšími látkami byly z derivátů pyrazin-2-karboxamidu MD458, MD528; z derivátů 3-hydrazinopyrazin-2-karboxamidu DK-5, DK-19; z derivátů benzoxazinu RAM 347, RAM 351, RAM 348.
8. Abychom bylo možné vyvodit závěry z našeho testování je nutno provést ještě další testy.

7. PŘÍLOHY

7.1 PŘÍLOHA Č.1

Výpočet objemu DMSO

Koncentrace DMSO v jamce nesmí přesáhnout 1%, proto při přípravě pracovních roztoků přidáme k růstovému médiu (1,98ml) jen 1% látky rozpuštěné v DMSO (20μl), z toho důvodu musíme připravit látku 100x koncentrovanější (aby 1. testovaná koncentrace byla 500μmol/l).

$$V_{\text{DMSO}} = \frac{m \cdot 10^6}{c \cdot M \cdot 100 (\text{zakoncentrování})} = \underline{\text{x } \mu\text{l DMSO}}$$

V_{DMSO} – objem DMSO

m – navážka (g)

c – 1. testovaná koncentrace = 500μmol.l⁻¹ = 0,0005mol.l⁻¹

M – molární hmotnost

7.2 PŘÍLOHA Č.2

Tab. 14 Složení RPMI 1640

Dusičnan vápenatý tetrahydrát	0,5	L- prolin	0,1
Chlorid draselný	2,0	L- serin	0,15
Hydrogen fosforečnan sodný .2H ₂ O	5,015	L-treonin	0,1
Síran hořečnatý heptahydrát	0,5	L- tryptofan	0,025
Chlorid sodný	30,0	L- tyrosin	0,1
L- arginin hydrochlorid	1,21	L- valin	0,1
L- asparagin monohydrát	0,27	Biotin	0,001
L- cystin	0,25	Cyanocobalamin	0,000025
L- glutamin	1,5	Cholin chlorid	0,015
Glutathion	0,005	I- inositol	0,175
Glycin	0,05	Kyselina listová	0,005
L- histidin HCl H ₂ O	0,102	Kyselina <i>p</i> - aminobenzová	0,005
L- hydroxyprolin	0,1	Nikotinamid	0,005
L- isoleucin	0,25	D- Ca- Pantothenát	0,00125
Kyselina L- asparagová	0,1	Pyridoxin hydrochlorid	0,005
Kyselina L- glutamová	0,1	Riboflavin	0,001
L- leucin	0,25	Thiamid hydrochlorid	0,005
L-lysin hydrochlorid	0,2	Glukóza	10,0
L- methionin	0,075	Fenolčerveň	0,05
L- phenylalanin	0,075		

8. SEZNAM LITERATURY

1. BAJEROVÁ, K., Vyhodnocení potencionálně antifungálních látek pomocí mikrodiluční bujónové metody VII., Diplomová práce, Hradec králové, 2001.
2. BUCHTA, V., JÍLEK, P., HORÁČEK, J., HORÁK, V., Základy mikrobiologie a parazitologie pro farmaceuty. Praha, Karolinum, 1998, s. 51-63,143-157.
3. DAVEY, K.G. et al.: Evaluation of the AUXACOLOR system, a new method of clinical yeast identification. *J Clin Pathol.* 1995; 48(9): 807–809.
4. FRAGNER, P.: Malá lékařská mykologie. Praha, Avicenum zdravotnické nakladatelství, 1984, s. 9, 18,26-27,61-150.
5. GREENWOOD, D., SLACK, R. C. B., PEUTHERER, S. F. et al.: Lékařská mikrobiologie, Praha, Grada publishing, 1999, s. 563-582.
6. HABER J.: Lipidový komplex amfotericinu B – stále významná role mezi ostatními antimykotiky v léčbě invazivní aspergilózy. Analýza klinických studií. *Remedia* 2007; 17: 412–420.
7. HABER, J., MALLÁTOVÁ, N., HEROLD, I.: Anidulafungin – nové antimykotikum ze skupiny echinokandinů, 2008;5, .
<http://www.farmakoterapie.cz/cz/Clanek/994>
8. HARTL, J., PALÁT, K.: Farmaceutická chemie IV (chemoterapeutika), Praha, Karolinum 1992
9. http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Aspergillus_fumigatus.jpg
10. http://labmed.ucsf.edu/education/residency/fung_morph/fungal_site/yeastpage.html
11. http://www.cancidas.com/caspofungin_acetate/cancidas/hcp/product_information/pi/index.jsp
12. <http://www.clarku.edu/faculty/dhibbett/TFTOL/content/1introprogress.html>
13. <http://www.detskaonkologie.cz/medical/prezentace/Nekultivacni%20prukaz%20mykotickych%20infekci.pdf>
14. <http://www.doctorfungus.org>
15. http://www.doctorfungus.org/imageban/index_enlarge.pl
16. <http://www.flickr.com/photos/neilhawthorne/170633329/>

17. <http://www.hardydiagnostics.com/catalog2/hugo/HardyCHROMCandida.html>
18. http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Dermatophytes/Trichophyton/mentagrophytes.html
19. http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Zygomycetes/Absidia/
20. <http://www.mycology.adelaide.edu.au/gallery/photos/candida26.html>
21. <http://www.nature.com/bmt/journal/v25/n7/full/1702231a.html>
22. <http://www.splm.cz/Fotobanka?id=140>
23. <http://www.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/cand-trop.htm>
24. JANDEROVÁ, B., BENDO VÁ O.: Úvod do biologie kvasinek. Praha, Karolinum, 1999, s. 81-83, 91-98.
25. KATZUG, B. G., Základní a klinická farmakologie, Lange Medical Books/McGraw-Hill, Medical Publishing Division 2001, Nakladatelství H&H Vyšehradská, s.r.o. 2006.
26. KELLEROVÁ, J., ROZEHNALOVÁ, Z., SCHIEDBERGEROVÁ, R., HERCOGOVÁ, J.: Itrakonazol, Farmakoterapie 2007;3.; <http://www.farmakoterapie.cz/cz/Clanek/655>
27. LEKSOVÁ, R., Hodnocení antifungální aktivity látek s potencionálním antimikrobním účinkem pomocí diskové difuzní metody. Diplomová práce, Hradec Králové, 1996
28. LINCOVÁ, D., FARGHALI, H. et al.: Základní a aplikovaná farmakologie. Praha, Galén, 2007, s. 506-514.
29. MALLÁTOVÁ, N.: Stanovení citlivosti mikromycet k antimykotikům a interpretace výsledků. Klin mikrobiol inf lék 2007;13(4):151-155.
30. OTČENÁŠEK, M. et al.: Vyšetřovací metody při mykotických onemocněních. Praha, Avicenum zdravotnické nakladatelství, 1990, s. 113-129.
31. RÁČIL, Z., KOČMANOVÁ, I., WEINBERGEROVÁ, B., WINTEROVÁ, J., BOHATÁ, Š., MAYER, J.; Léčba invazivních mykotických infekcí u onkologických nemocných. Farmakoterapie 2008; 2; <http://www.farmakoterapie.cz/cz/Clanek/878>

32. ROZSYPAL, H.: Systémová antimykotika, Klinická farmakologie a farmacie 2008; 22(1): 40-44.
33. SKOŘEPOVÁ, M.: Současné možnosti terapie onychomýkóz. Farmakoterapie 2007;4; <http://www.farmakoterapie.cz/cz/Clanek/659>
34. TICHÝ, J.: Invazivní mykotické infekce na jednotkách intenzivní péče, Medical Tribune 2009, 4, str B3 ;<http://www.tribune.cz/archiv/mtr/240/6881>
35. VOTAVA, M.: Lékařská mikrobiologie obecná, Brno, Neptun, 2005, s. 62-72, 298-301.

9. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1 Zygospora rodu *Zygorhynchus*

Obr. 2 Typická pohárovitě-tvarovaná plodnice Ascomycetes, druh *Galiella*

Obr. 3 Charakteristický tvar plodnic třídy Basidiomycetes

Obr. 4 Systém lékařsky významných hub

Obr. 5 *C. albicans* na Sabouraudově glukózovém agaru s typickými krémově zbarvenými, voskovitými, na povrchu hladkými koloniemi, po 7 denní kultivaci při 35°C.

Obr. 6 *Candida tropicalis* na Sabouraudově glukózovém agaru po 7 denní inkubaci při 35°C

Obr. 7 *Candida krusei* na Sabouraudově glukózovém agaru po 7 denní inkubaci při 35°C

Obr. 8 *Candida glabrata* na Sabouraudově agaru po 7 denní inkubaci při 35°C

Obr. 9 Vzrostlá, voskovitá kolonie *Trichosporon beigelii* na Sabouraudově glukózovém agaru, při 30°C

Obr. 10 *Trichosporon beigelii* na Sabouraudově agaru po 7 denní inkubaci při 30° C

Obr. 11 *Absidia corymbifera* s typicky hruškovitě-tvarovaným sporangiem

Obr. 12 *Aspergillus fumigatus* na Czapkově agaru po 7 dnech růstu při 25 °C

Obr. 13 Rod *Asperillus* na Sabouradově glukózovém agaru s chloramfenikolem

Obr. 14 Mikrokonidie, makrokonidie a spirální vlákna *T. mentagrophytes*

Obr. 15 Kultura *Trichophyton mentagrophytes* na Sabouraudově glukózovém agaru.

Obr. 16 CHROMagar *Candida* ukazující různé barevné rozlišení kvasinek na chromogenním médiu *C. albicans* (zelená), *C. tropicalis* (modrá), *C. parapsilosis* (bílá) and *C. glabrata* (růžová).

Obr. 17 Germ tube test (test indukce tvorby klíčících hyf), identifikace *C. albicans*.
Produkce tzv. Germ tubes *C. albicans* v plazmě po 2-3 h. inkubaci při 37°C.

Obr. 18 Uni-yeast-Tek znázorňující různé zkoušky schopnosti asimilace. Deska používaná pro identifikaci kvasinek.

Obr. 19 Amfotericin B

Obr. 20 Nystatin

Obr. 21 Natamycin

Obr. 22 Fluytosin

Obr. 23 Mikonazol

Obr. 24 Ketokonazol

Obr. 25 Flukonazol

Obr. 26 Itrakonazol

Obr. 27 Vorikonazol

Obr. 28 Posakonazol

Obr. 29 Ekonazol

Obr. 30 Klotrimazol

Obr. 31 Fentikonazol

Obr. 32 Tiokonazol

Obr. 33 Griseofulvin

Obr. 34 Terbinafin

Obr. 35 Fluconazole Etest a disk test pro *Candida albicans*

Obr. 36 Pipetování pomocí osmi kanálové pipety do mikrodestičky

10. SEZNAM TABULEK

Tab. 1 Přehled testovaných skupin látek

Tab. 2 Deriváty 3-hydrazinopyrazin-2-karboxamidu

Tab. 3 Deriváty 3-hydrazinopyrazin-2-karboxamidu

Tab. 4 5-kyan-3-[(3ethynylfenyl)amino]pyrazin-2-karboxamid

Tab. 5 Deriváty benzoxazinu

Tab. 6 Deriváty 2-isonikotinoylhydrazinkarboxylátu

Tab. 7 Deriváty pyrazin-2-karboxamidu

Tab. 8 Deriváty pyrazin-2-karboxamidu

Tab. 9 Deriváty pyrazin-2-karboxamidu a 5-kyan-3-[(3ethynylfenyl)amino]pyrazin-2-karboxamid

Tab. 10 Deriváty 3-hydrazinopyrazin-2-karboxamidu

Tab. 11 Deriváty benzoxazinu

Tab. 12 Deriváty benzoxazinu a Deriváty 2-isonikotinoylhydrazinkarboxylátu

Tab. 13 Interpretační kritéria standardu CLSI M27 (MIC v g/ml)

Tab. 14 Složení RPMI 1640

11. SEZNAM ZKRATEK

AC - *Absidia corymbifera*

AF - *Aspergillus fumigatus*

AIDS – syndrom získané ztráty imunity

ALT - alanin aminotransferáza

ATM - antimykotika

CA - *Candida albicans*

cfu/ml – colony forming units/ml

CG - *Candida glabrata*

CK - *Candida krusei*

CNS – centrální nervový systém

cps. - kapsle

crm. - krém

crm.vag. – vaginální krém

CT - *Candida tropicalis*

DMSO - dimethylsulfoxid

ELISA - **E**nzyme-**L**inked **I**mmuno**S**orbent **A**ssay

HIV – Human Immunodeficiency Virus, virus lidské imunitní nedostatečnosti

i.v.inj. – intravenózní injekce

IC₅₀ – inhibiční koncentrace

IgE – imunoglobulin typ E

inf. - infuze

inj. - injekce

inj. sic. – suchá injekce

liq. - roztok

lot. - mléko

MFC - minimální fungicidní koncentrace

M.H. – molekulární hmotnost

MIC - minimální inhibiční koncentrace

MOPS - 3-(N-morfolino)propansulfonová kyselina

NaOH – hydroxid sodný

PAS - barvení Schiffovou netodou

pst. - pasta

RNA – ribonukleová kyselina

RPMI 1640 - 5x koncentrované definované růstové médium obsahuje hydrouhličitanový
pufrací systém a množství aminokyselin a vitamínů (kompletní složení RPMI 1640
viz. Příloha č.2)

SDD – (Susceptible-Dose Dependent) citlivý v závislosti na dávce

shp. - šampón

sir. - sirup

sol. - roztok

spr. - sprej

sus. - suspenze

TB - *Trichosporon beigeli*

tbl .obd. – obalované tablety

tbl. - tableta

TM - *Trichophyton mentagrophytes*

ung. - mast

vag.tbl. – vaginální tableta